

ホウ素をセンシング部位とする蛍光プローブの  
分子デザインと適用に関する研究

下村 有輝



## 目次

略語と記号	・・・1
総論の部	
緒言	・・・2
<b>第1章: 近赤外領域 (650~900 nm) に光学特性を示すボロン酸修飾シアニン系蛍光プローブ (CyBA) の分子デザイン</b>	
第1節 小緒言	・・・5
第2節 近赤外領域に光学特性を示すボロン酸修飾シアニン系蛍光色素 (CyBA) の合成	
2-1 CyBA の合成と構造決定	・・・7
2-2 CyBA の光学特性調査	・・・9
2-3 CyBA の pH 依存性調査	・・・10
第3節 CyBA のポリオール結合性の評価	・・・11
第4節 CyBA の過酸化水素 (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) 反応性の調査	・・・15
第5節 小括	・・・17
<b>第2章: ホウ素含有新規骨格 (ボリン酸含有キサントゲン骨格) による蛍光プローブ (JoSai-Red: JS-R) の分子デザイン</b>	
第1節 小緒言	・・・18
第2節 ボリン酸残基を蛍光性骨格内に有する新規蛍光色素 (JS-R) の合成	
2-1 JS-R の合成と構造決定	・・・20
2-2 JS-R の光学特性調査	・・・23

2-3 JS-R の pH 依存性調査	・ ・ ・ 24
第 3 節 JS-R のポリオール結合性及び光学変化メカニズムの調査	・ ・ ・ 26
第 4 節 JS-R の H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 反応性の調査	
4-1 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 反応性の調査	・ ・ ・ 31
4-2 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> との反応後の生成物の調査	・ ・ ・ 34
第 5 節 小括	・ ・ ・ 36
<b>第 3 章: CyBA 及び JS-R の適用に関する検討</b>	
第 1 節 小緒言	・ ・ ・ 37
第 2 節 CyBA、JS-R のポリオール結合特性及び H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 反応性の比較	
2-1 糖選択性の比較	・ ・ ・ 39
2-2 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 反応性の比較	・ ・ ・ 40
第 3 節 CyBA の in vivo 蛍光イメージングへの適用の検討	・ ・ ・ 43
第 4 節 JS-R とグルコースオキシダーゼ (GOx) を組み合わせたグルコース センサーへの適用の検討	・ ・ ・ 47
第 5 節 小括	・ ・ ・ 50
<b>総括</b>	・ ・ ・ 51
<b>謝辞</b>	・ ・ ・ 53
<b>実験の部</b>	
試薬、材料及び使用機器	・ ・ ・ 54
第 1 章	・ ・ ・ 56
第 2 章	・ ・ ・ 64



第 3 章

· · · 72

参考文献

· · · 76

## 略語と記号

略語	
近赤外領域	650~900 nm (生体の窓) の波長領域
ポリオール	ヒドロキシ基を複数有する化合物
ROS	活性酸素種 (Reactive oxygen species)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	過酸化水素 (Hydrogen peroxide)
CyBA	ボロン酸修飾ヘプタメチンシアニン系蛍光性センサー分子
JS-R	蛍光団内にボリン酸を内包した蛍光性センサー分子 (JoSai-Red)
B-N結合	ホウ素-窒素間の配位結合
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
Fru	D-フルクトース (D-Fructose)
Glc	D-グルコース (D-Glucose)
Gal	D-ガラクトース (D-Galactose)
Man	D-マンノース (D-Mannose)
Fuc	L-フコース (L-Fucose)
Sor	D-ソルビトール (D-Sorbitol)
Neu5Ac	<i>N</i> -アセチルノイラミン酸 ( <i>N</i> -Acetylneuraminic acid)
Neu5Gc	<i>N</i> -グリコリルノイラミン酸 ( <i>N</i> -Glycolylneuraminic acid)
CA	カテコール (Catechol)
JS-R/CA	JS-RとCAの環状エステル複合体
JS-R/Fru	JS-RとFruの環状エステル複合体
NMR	核磁気共鳴 (Nuclear magnetic resonance)
FAB-MS	高速原子衝撃法-質量分析 (Fast atom bombardment-mass spectrometry)
EI-MS	電子イオン化法-質量分析 (Electron ionization-mass spectrometry)
DFT	密度汎関数法 (Density functional theory)
HOMO	最高被占軌道 (Highest occupied molecular orbital)
LUMO	最低空軌道 (Lowest unoccupied molecular orbital)
4IQBA	4-イソキノリンボロン酸 (4-Isoquinolineboronic acid)
GOx	グルコースオキシダーゼ (Glucose oxidase)
PVA	ポリビニルアルコール (Polyvinyl alcohol)
DMSO	Dimethyl sulfoxide
PBS	Phosphate buffered saline

記号	
$\lambda_{\text{abs}}$	吸収極大波長
$\lambda_{\text{ex}}$	励起波長
$\lambda_{\text{em}}$	蛍光極大波長
$\Phi$	蛍光量子収率
$K$	結合定数
$k$	反応速度定数

## 総論の部

### 緒言

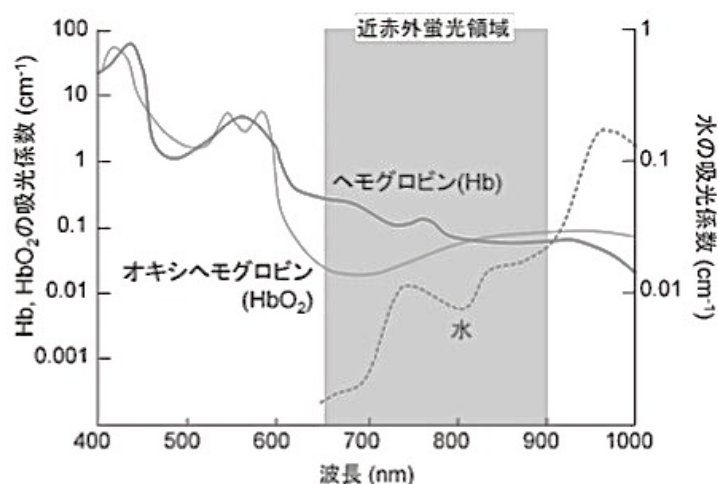
蛍光測定は、比較的高感度に定性から定量まで利用可能であり、蛍光イメージング装置の進歩とともに様々な蛍光プローブが開発されてきた。今日まで、ラベル化試薬や蛍光性センサー分子等の蛍光プローブは、生理学的機能の解明や検査等に重要な役割を担ってきた。生命科学分野で用いられる蛍光性センサー分子は、その利用目的に応じた様々な性質が求められる (Table 1)。蛍光性センサー分子の設計は、Table 1 に示した全ての性質を満たす必要はなく、目的に応じた性質を利用することで、センサーとして機能することが期待できる。

**Table 1.** Desired properties of fluorescent sensor molecules.

蛍光性センサー分子に求められる性質
高い蛍光量子収率を示す。
特定の波長領域に光学特性を示す。(近赤外領域(生体の窓領域): 650~900 nmが望ましい。)
特定の領域のpHに応答する。
広いpH範囲で安定した蛍光強度を示す。
特定の分子あるいはイオンに対して特異的に結合する。
特定の分子認識において蛍光強度変化を示す。
特定の分子認識において蛍光波長変化を示す。
物理化学的に安定性が高い。
特定の刺激により安定性が変化する。

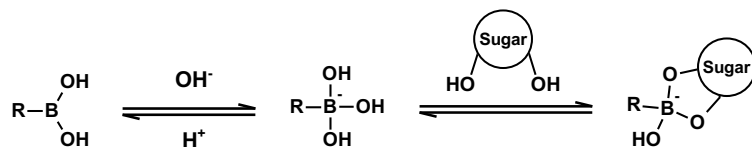
近年では、*in vivo* 蛍光イメージングに関する研究が多数報告されている<sup>1,2</sup>。生体の窓と呼ばれる近赤外領域 (650-900 nm) の光は、生体構成成分である水やヘモグロビン等による吸収や自家蛍光の影響を受けにくく、組織透過性が高いという特徴がある (Figure 1)<sup>3</sup>。この特徴は、*in vivo* 蛍光イメージングへの利用に有望とされている。そのことから、近赤外領域に吸収と蛍光を示す蛍光色素の需要が高まっている。特定領域の pH に応答する性質を有することで、pH 指示薬等への利用に期待できる<sup>4,5</sup>。一方、pH 変化に対して安定した蛍光特性を示すことで、pH が変化する環境下において特定の分子認識への適用が期待できる<sup>6</sup>。また、特定の分子やイオンと結合する刺

激応答基を蛍光色素に導入することで、分子やイオンとの結合により、蛍光変化を示すセンサー分子として機能する<sup>7,8</sup>。更に、特定の刺激により物理化学的安定性が変化する性質を有する蛍光色素は、安定性の変化に伴う蛍光変化を利用した蛍光性センサー分子としての適用も期待できる。

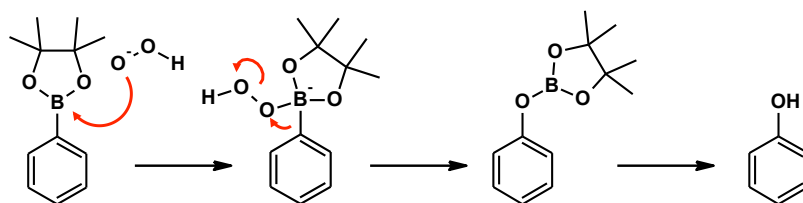


**Figure 1.** Absorption spectra with the biogenic substance and optical window<sup>3</sup>.

ボロン酸残基は、刺激応答基の一つとして注目を集めている。ボロン酸誘導体は、糖等が有する複数のヒドロキシ基 (ポリオール) と可逆的に環状エステル結合を形成することが知られている (Scheme 1)<sup>9,10</sup>。また、フェニルボロン酸誘導体は、過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 等の活性酸素種 (Reactive oxygen species: ROS) との反応により、不可逆的なボロン酸残基の脱離が生じ、フェノール誘導体へと変換される (Scheme 2)<sup>11,12,13</sup>。

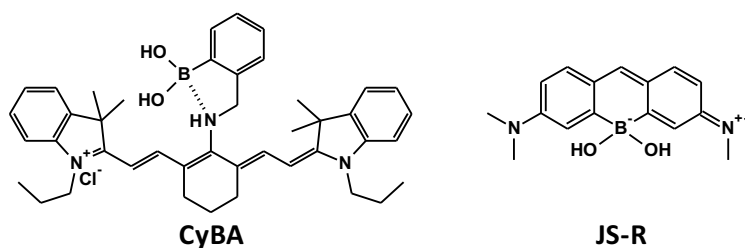


**Scheme 1.** Equilibrium of boronic acid derivatives and a sugar.



**Scheme 2.** Reaction of phenylboronic acid pinacol ester and  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

本研究では、ホウ素をセンシング部位とする2種類の新規蛍光性センサー分子をデザインし、その応用に関する検討を行った。第1章では、近赤外領域に光学特性を示す蛍光団にボロン酸部位を化学的に修飾し、新規蛍光性センサー分子 (Figure 2, CyBA) を得た。第2章では、蛍光団内にホウ素を導入した新規蛍光性センサー分子 (Figure 2, JoSai-Red: JS-R) を合成した。そして、第3章では第1章及び第2章で得られた新規蛍光性センサー分子の応用に関する検討を行った。

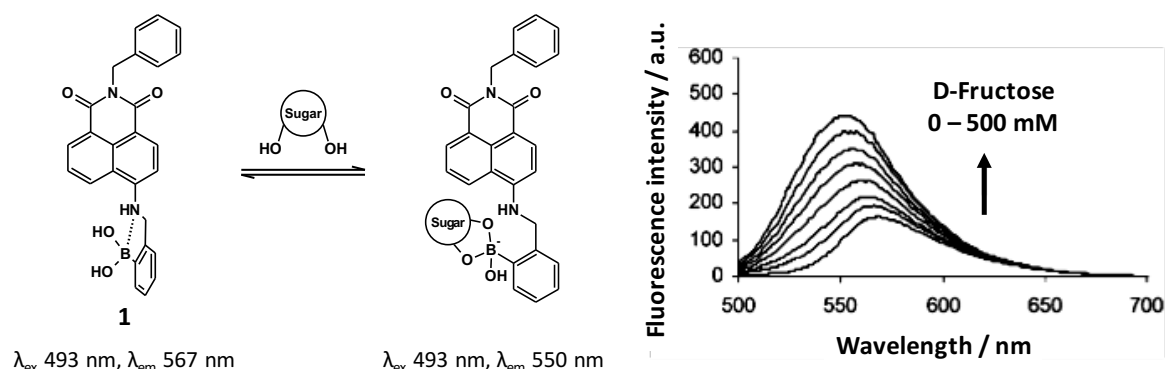


**Figure 2.** Structures of new fluorescent dyes.

## 第 1 章: 近赤外領域 (650~900 nm) に光学特性を示すボロン酸修飾シアニン系蛍光プローブ (CyBA) の分子デザイン

### 第 1 節 小緒言

Yoon らによって、蛍光性糖化学センサーとして機能するアントラセンボロン酸が 1992 年に報告された<sup>14</sup>。それ以来、Shinkai と James を中心とした多くの研究グループによって、ボロン酸部位を持つ蛍光性糖化学センサー分子が報告されてきた<sup>15,16,17,18,19</sup>。Jin らが報告したナフタルイミドを蛍光団としたボロン酸誘導体 **1** (Figure 3) は、493 nm での励起により、567 nm に蛍光極大を示す。また、フルクトース (Fru) 濃度の上昇に伴い、蛍光強度の増大及び、550 nm への蛍光極大の短波長変化を示す<sup>18</sup>。



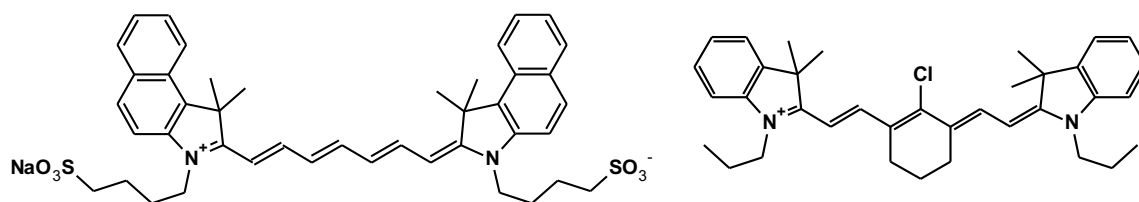
**Figure 3.** Suggested structural change and fluorescence spectra of **1** (50  $\mu$ M) upon addition of D-fructose (Fru) in 100 mM phosphate buffer at pH 7.4,  $\lambda_{ex}$  493 nm<sup>18</sup>.

しかしながら、500 nm 付近の可視光は、生体の窓の範囲外であり、生体成分による妨害を受けやすいことが懸念される。これらの課題を克服するためには、近赤外領域に吸収及び蛍光特性を示す分子設計が有望である。

肝機能検査薬として本国で承認されているインドシアニングリーン (ジアグノグリーン®; 第一三共株式会社) は、蛍光団としてヘプタメチンシアニン骨格を有し、近赤外領域に光学特性 ( $\lambda_{abs}$  ca. 775 nm,  $\lambda_{em}$  ca. 820 nm) を示すことが知られている (Figure 4, left)<sup>20</sup>。これまでに、近赤外領域で機能するヘプタメチンシアニン骨格を有

する様々な蛍光プローブが報告されてきた<sup>21,22</sup>。ヘプタメチンシアニンを基本骨格とした化合物の一つとして、IR-780が挙げられる (Figure 4, right)。IR-780も近赤外領域に光学特性 ( $\lambda_{\text{abs}}$  ca. 780 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  ca. 820 nm) を示す<sup>23,24</sup>。

本章では、ボロン酸部位を IR-780 に化学修飾し、近赤外領域で機能する蛍光性センサー分子 (Figure 2, CyBA) を合成し、その化学的特徴の調査とポリオール結合性及び  $\text{H}_2\text{O}_2$  反応性を調査した。

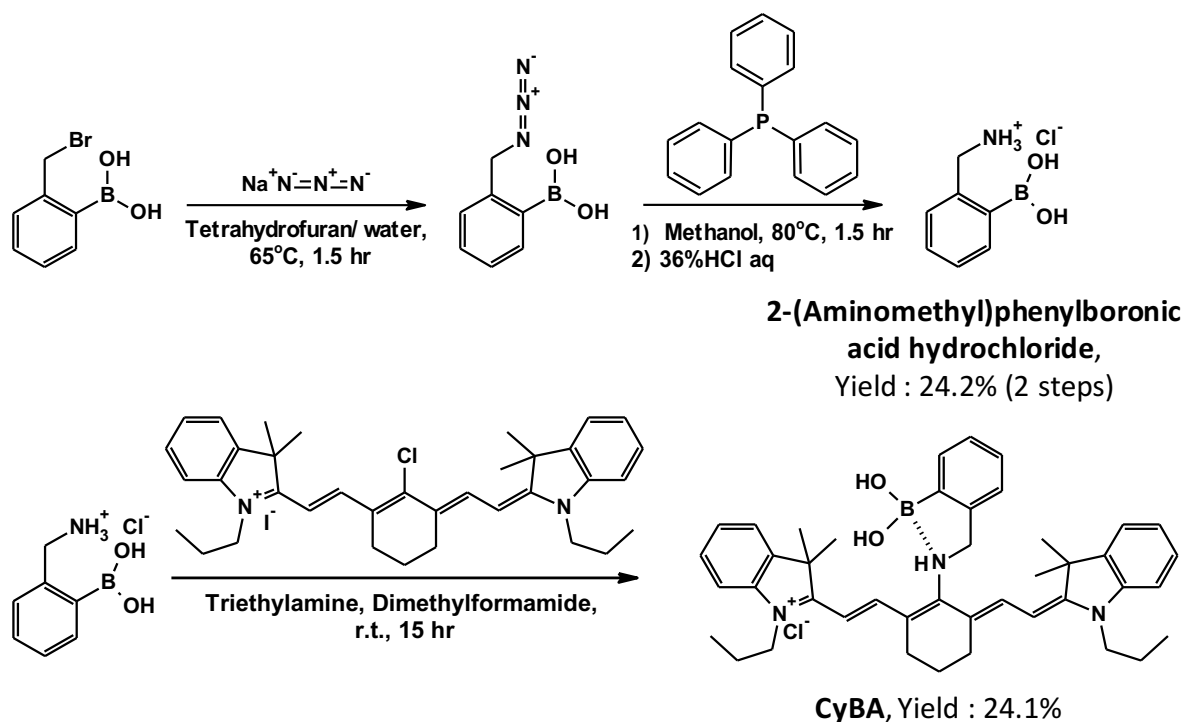


**Figure 4.** Structures of indocyanine green (left) and IR-780 (right).

## 第 2 節 近赤外領域に光学特性を示すボロン酸修飾シアニン系蛍光色素 (CyBA) の合成

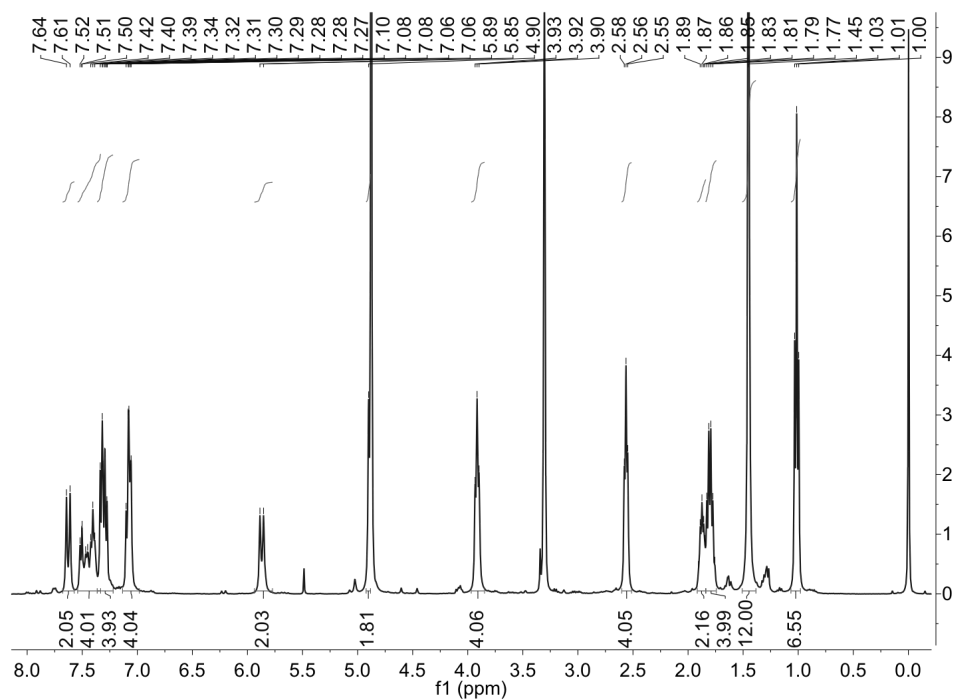
### 2-1 CyBA の合成と構造決定

CyBA を得るために、先ずボロン酸部位である 2-(aminomethyl)phenylboronic acid の合成を行った。2-(bromomethyl)phenylboronic acid を反応出発化合物として、2 段階の反応を経て 2-(aminomethyl)phenylboronic acid hydrochloride を 24.2% の収率で得た。続いて、これを *N,N*-dimethylformamide 及び triethylamine 中で、IR-780 iodide と反応させ、CyBA を 24.1% の収率で得た (Scheme 3)。CyBA は、核磁気共鳴 (NMR)、質量分析 (MS)、元素分析より構造決定を行った (Figures 5 and 6)。

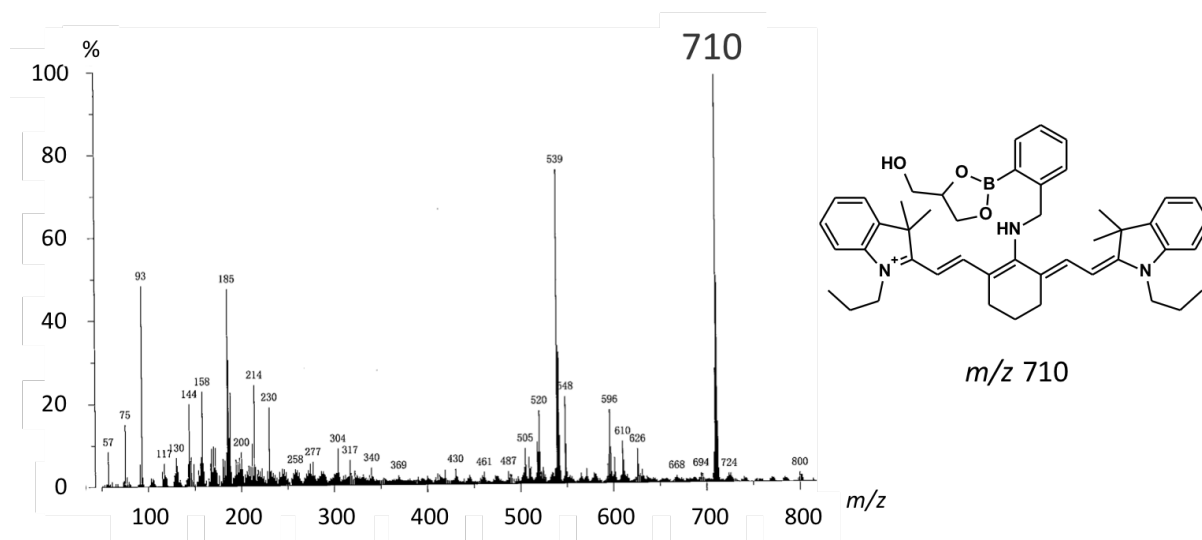


Scheme 3. Synthesis of CyBA.





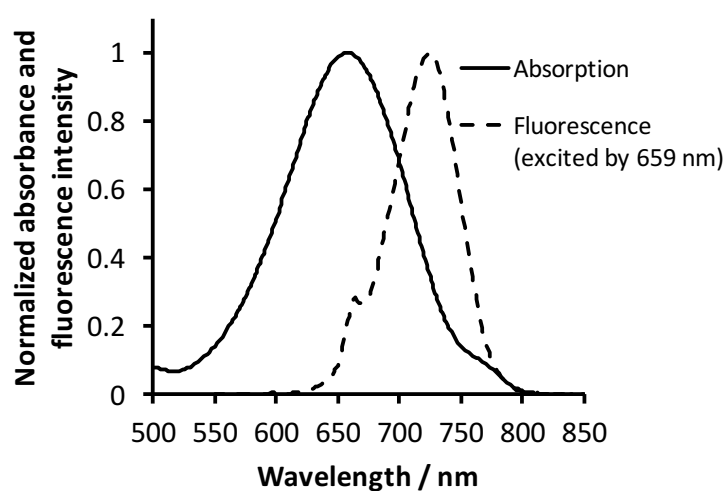
**Figure 5.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of CyBA in methanol- $d_4$ .



**Figure 6.** FAB-MS (positive mode) and structure of CyBA glycerin complex.

## 2-2 CyBA の光学特性調査

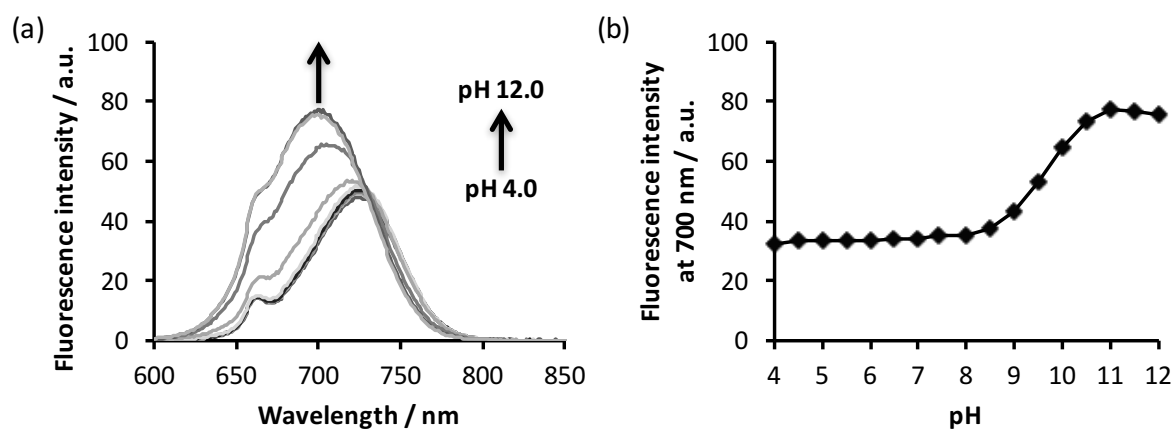
CyBA は、10 mM HEPES 含有 methanol/water (1/1, v/v, pH 7.4) 中において、659 nm に吸収極大を示し、モル吸光係数は  $1.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  であった。また、659 nm での励起により 726 nm に蛍光極大を示した。以上の調査から、CyBA は、近赤外領域に吸収と蛍光を示すことが明らかとなった (Figure 7)。また、methanol 中における CyBA の蛍光量子収率 ( $\Phi$ ) は、 $3.8 \times 10^{-3}$  であった。



**Figure 7.** Absorption and fluorescence ( $\lambda_{\text{ex}}$  659 nm) spectra of CyBA in methanol/water (1/1, v/v) containing HEPES (10 mM) solution at pH 7.4.

### 2-3 CyBA の pH 依存性調査

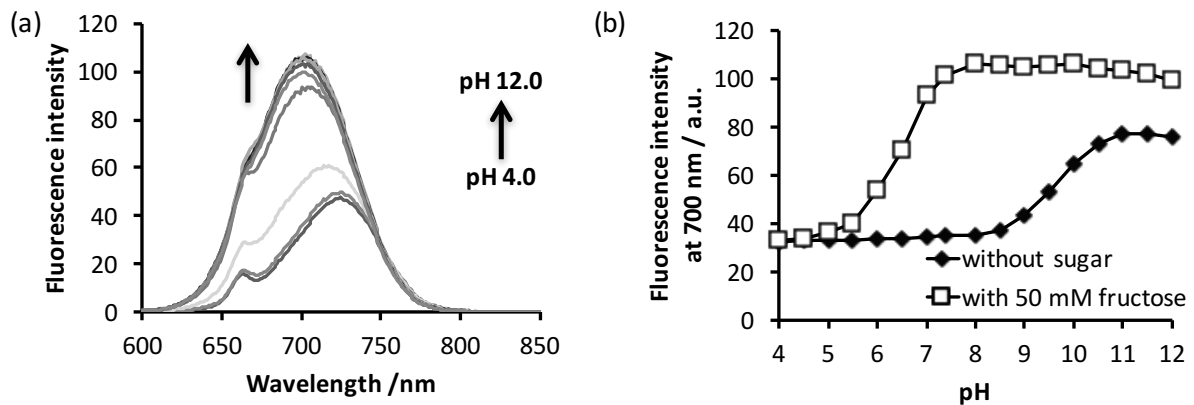
本項には、各 pH (pH 4.0-12.0) における CyBA の蛍光スペクトルの測定結果を示す。CyBA は、pH の上昇に伴い、蛍光強度の増大及び蛍光極大波長の短波長変化を示した。また、各 pH とその pH における 700 nm の蛍光強度のプロットを用いて算出した CyBA のホウ素の  $pK_a$  は、9.52 であった (Figure 8)。このことから、CyBA は、ホウ素に水酸化物イオンが配位することで、蛍光強度の増大と蛍光極大の短波長変化を示すと考えられる。



**Figure 8.** (a) Fluorescence spectra of 2.0 μM CyBA (pH 4.0-12.0) and (b) pH profile of the fluorescence intensity at 700 nm of 2.0 μM CyBA. All samples were measured in methanol/water (1/1, v/v) containing 10 mM HEPES solution,  $\lambda_{ex}$  659 nm. The  $pK_a$  value of CyBA was 9.52.

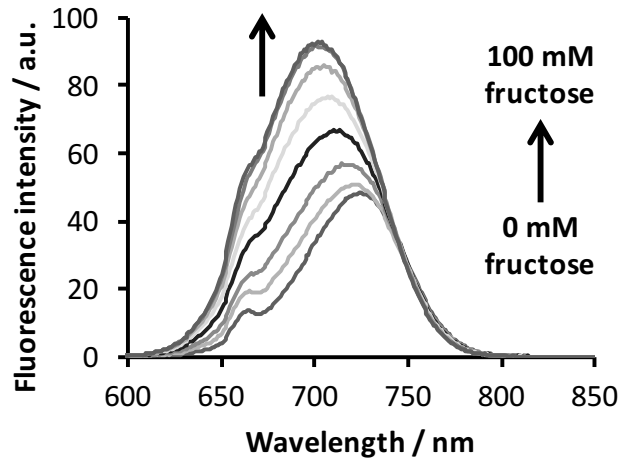
### 第3節 CyBA のポリオール結合性の評価

CyBA に 50 mM Fru を添加し、各 pH (pH 4.0-12.0) における蛍光スペクトルを測定した。Fru 共存下においても、pH の上昇に伴い、蛍光強度の増大と蛍光極大の短波長変化を示した。また、50 mM Fru 共存下において、CyBA のホウ素の  $pK_a$  は、6.38 に低下した (Figure 9)。



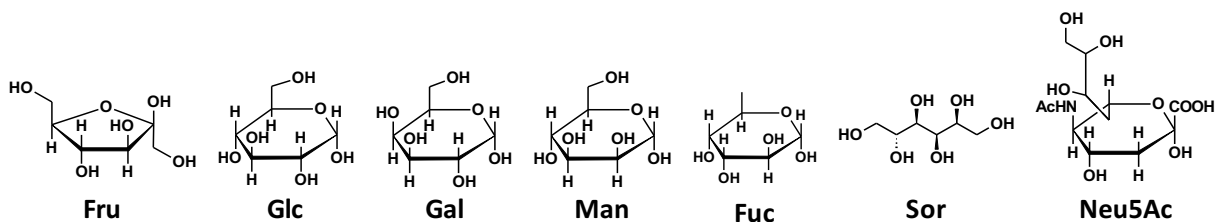
**Figure 9.** (a) Fluorescence spectra of 2.0  $\mu$ M CyBA with 50 mM Fru. (b) pH profile of the fluorescence intensity at 700 nm of 2.0  $\mu$ M CyBA in the absence and presence of 50 mM Fru. All samples were measured in methanol/water (1/1, v/v) containing 10 mM HEPES solution,  $\lambda_{ex}$  659 nm. The  $pK_a$  value of CyBA with 50 mM Fru was 6.38.

Figure 9 (b) から、CyBA は中性条件下でポリオール結合に伴う蛍光変化が最大であることがわかった。そこで、中性条件下において、各種 Fru 濃度 (0, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 mM) における CyBA の蛍光スペクトルを測定した。Fru 濃度の上昇に伴い、蛍光強度の増大及び蛍光極大の 700 nm への短波長変化を示した (Figure 10)。これは、ポロン酸残基への Fru の結合により環状エステルを形成し、ホウ素の  $pK_a$  が低下したことで、中性条件下でホウ素に水酸化物イオンが配位し、蛍光変化をもたらしたと考えられる。



**Figure 10.** Fluorescence spectra of 2.0  $\mu\text{M}$  CyBA upon addition of Fru (0-100 mM) in methanol/water (1/1, v/v) containing 10 mM HEPES solution at pH 7.4,  $\lambda_{\text{ex}}$  659 nm.

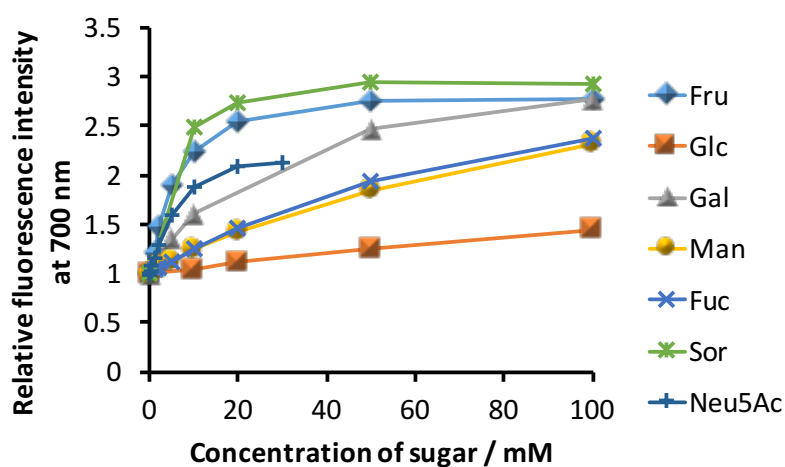
Fru、グルコース (Glu)、ガラクトース (Gal)、マンノース (Man)、フコース (Fuc)、ソルビトール (Sor)、*N*-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac) は、代表的な生体構成糖質である (Figure 11)。特に、Neu5Acは代表的なシアル酸であり、生理機能に関与しており、バイオセンシングのターゲットとなり得る。そこで、中性条件下で Fru、Glu、Gal、Man、Fuc、Sor、Neu5Ac を添加したときの蛍光強度に基づいて各種糖類に対する結合定数  $K$  を算出し、ポリオール結合性を評価した (Figure 12, Table 2)。Fru、Sor、Neu5Ac の結合定数は、比較的高い値を示したことから、CyBA は Fru、Sor、Neu5Ac に対して高い親和性を示すと考えられる。



**Figure 11.** Structures of D-fructose (Fru), D-glucose (Glc), D-galactose (Gal), D-mannose (Man), L-fucose (Fuc), D-sorbitol (Sor) and *N*-acetylneuraminic acid (Neu5Ac).

**Table 2.** Binding constants ( $K$ ) of CyBA to sugars.

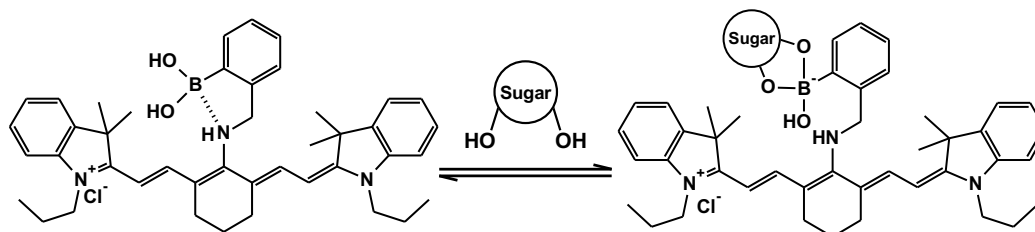
Sugars	Binding constants $K$ ( $M^{-1}$ )
Fru	173.2
Glc	4.0
Gal	35.6
Man	11.1
Fuc	12.0
Sor	317.0
Neu5Ac	135.4



**Figure 12.** Titration curve of fluorescence intensity at 700 nm of 2.0  $\mu$ M CyBA (methanol/water (1/1, v/v) containing 10 mM HEPES solution at pH 7.4,  $\lambda_{ex}$  659 nm) against sugar concentration.

CyBA が、蛍光変化によるポリオール応答性を示したメカニズムについて、Jin らが報告した **1** (Figure 3) の応答メカニズムを基に考察した。**1** は、糖濃度の上昇に伴って、蛍光強度の増大と蛍光極大の短波長変化を示す。糖不在下の **1** は、ホウ素と近接するアミノ基の窒素が配位結合 (B-N 結合) を形成している。一方、糖共存下でボロン酸残基が糖と環状エステルを形成すると、ホウ素の  $pK_a$  が低下し、水酸化物イオンがホウ素に配位して B-N 結合が切断される。この B-N 結合の開裂が、蛍光極大の短波長変化と蛍光強度の増大をもたらすとされている (Figure 3)<sup>18</sup>。本章で合成した CyBA も **1** と同様に、ポリオール濃度の上昇に伴って、蛍光強度の増大と蛍光極大の

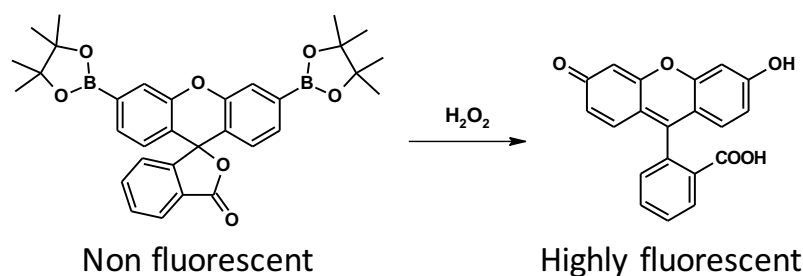
短波長変化を示した。そのことから、**1**と同様のポリオール応答メカニズムであると推察される (Scheme 4)。



**Scheme 4.** Proposed mechanism for polyol induced fluorescence change of CyBA.

#### 第4節 CyBA の過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 反応性の調査

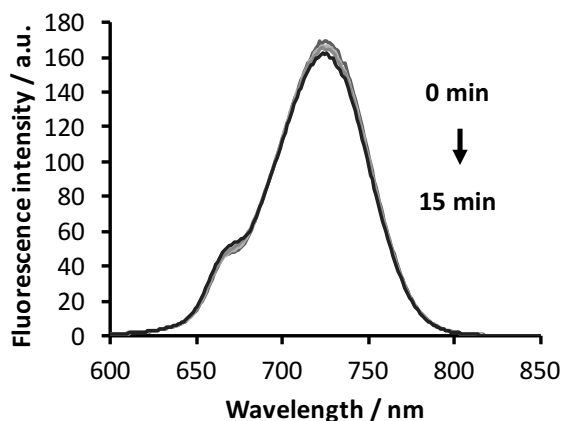
ボロン酸残基を持つ蛍光色素は、 $\text{H}_2\text{O}_2$  との反応により、ボロン酸残基とヒドロキシ基の交換が起こり、蛍光変化を示す (Scheme 5)<sup>11,12</sup>。



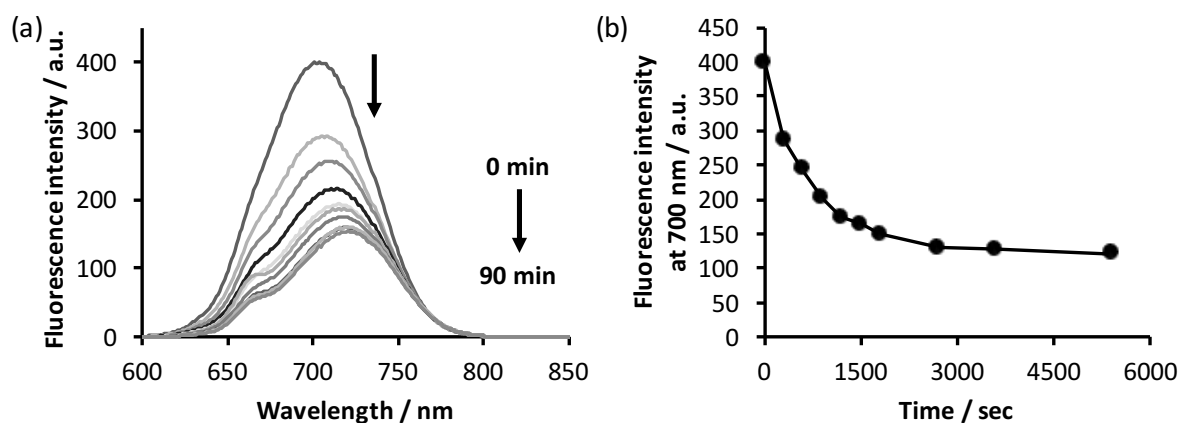
**Scheme 5.** Boronate modified fluorescent probe for detection of  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

CyBA も  $\text{H}_2\text{O}_2$  との反応によるボロン酸残基とヒドロキシ基の置換が生じ、蛍光変化を示すと予想された。しかしながら、環状エステルを形成していない CyBA は、 $\text{H}_2\text{O}_2$  を添加しても蛍光変化を示さなかった (Figure 13)。一方、50 mM Fru 共存下で環状エステルを形成した CyBA は、 $\text{H}_2\text{O}_2$  の添加により、継時的なスペクトル変化を示した (Figure 14)。この蛍光変化は、 $\text{H}_2\text{O}_2$  との反応によりボロン酸残基がヒドロキシ基に変換されたためであると考えられる。このことから、環状エステルを形成していない CyBA は、 $\text{H}_2\text{O}_2$  によるボロン酸残基の置換反応が起こらない可能性が示唆された。これは、環状エステルを形成していない CyBA が、B-N 結合を形成することで、 $\text{H}_2\text{O}_2$  によるホウ素への付加反応が起こりにくくなったためであると推察される。また、一定時間経過後の 700 nm の蛍光強度が一定となった (Figure 14b)。この時、環状エステルを形成した CyBA と  $\text{H}_2\text{O}_2$  との反応が終了したものと推察される。この反応は、CyBA が環状エステルの形成と水酸化物イオンの配位により、B-N 結合が開裂したことで、 $\text{H}_2\text{O}_2$  のホウ素への付加が容易になったために生じたと推察される。以上のことから、CyBA は、環状エステルを形成することで、 $\text{H}_2\text{O}_2$  反応性が高まると考えられる (Scheme 6)。

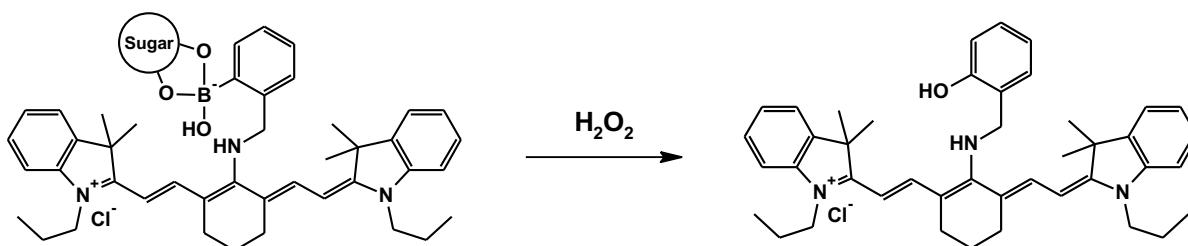




**Figure 13.** Time dependence of fluorescent spectral changes for 2.0  $\mu\text{M}$  CyBA without polyol upon addition of 1.0 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0-15 min), measured in methanol/water (1/1, v/v) containing 10 mM HEPES buffer at pH 7.4,  $\lambda_{\text{ex}}$  659 nm.



**Figure 14.** (a) Time dependence of fluorescence spectral changes of 2.0  $\mu\text{M}$  CyBA with 50 mM Fru upon addition of 1.0 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  addition (0-90 min). (b) Plot of fluorescence intensity at 700 nm upon addition of 1.0 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . All samples were measured in methanol/water (1/1, v/v) containing 10 mM HEPES solution at pH 7.4,  $\lambda_{\text{ex}}$  659 nm.



**Scheme 6.** Proposed structural change of CyBA cyclic ester form reacted with  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

## 第5節 小括

本章では、ヘプタメチンシアニン骨格を有する IR-780 にボロン酸部位を化学的に修飾することで、新規蛍光性センサー分子 CyBA を得ることができた。その特徴の要約を Table 3 に示す。CyBA は、近赤外領域に光学特性 ( $\lambda_{\text{abs}}$  659 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  726 nm) を示し、糖不在下及び共存下において、それぞれ pH 9 以上及び pH 6 以上の pH 条件下で蛍光変化を示した。また、Neu5Ac 等に高い結合性を示し、環状エステルを形成することで蛍光強度の増大と蛍光極大の短波長変化を示した。これは、環状エステルの有無による B-N 結合の形成と開裂に基づく構造変化が、蛍光変化をもたらしたと推察される。更に、CyBA は、環状エステルの有無により、 $\text{H}_2\text{O}_2$  に対する反応性が異なり、環状エステルを形成することで  $\text{H}_2\text{O}_2$  反応性が高まると考えられる。

**Table 3.** Characters as fluorescent dye of CyBA.

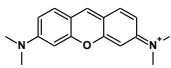
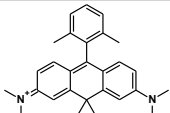
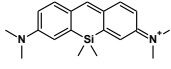
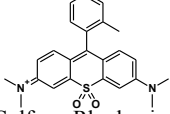
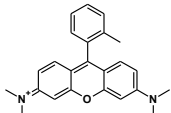
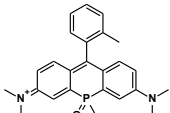
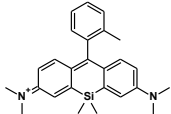
CyBAの蛍光色素としての性質
近赤外領域 ( $\lambda_{\text{ex}}$ 659 nm, $\lambda_{\text{em}}$ 726 nm) に光学特性を示す。
糖不在下ではpH 9以上、糖共存下ではpH 6以上で蛍光変化する。
Fru、Sor、Neu5Acに高い結合性を示す。
環状エステルの形成に伴い、蛍光強度が増大する。
環状エステルの形成に伴い、蛍光極大が短波長変化する。
環状エステル形成時に $\text{H}_2\text{O}_2$ 添加により安定性が変化する。

## 第 2 章: ホウ素含有新規骨格 (ボリン酸含有キサンテン骨格) による蛍光プローブ (JoSai-Red: JS-R) の分子デザイン

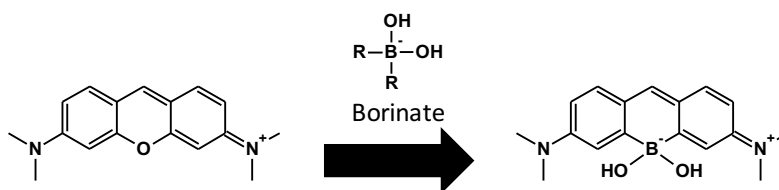
### 第 1 節 小緒言

ローダミン誘導体に代表されるキサンテン系蛍光色素は、物理化学的に安定性が高く、蛍光量子収率が高いことが知られている<sup>25</sup>。近年では、ローダミン誘導体の蛍光団であるピロニン構造内の酸素原子を炭素、ケイ素、リン、硫黄等に置換した蛍光色素は、近赤外領域付近の長波長可視領域に吸収と蛍光を示し、高い蛍光量子収率を示すことが報告されている<sup>26,27,28,29,30</sup>。最近では、ピロニン酸素原子を置換した蛍光色素を応用した蛍光プローブ開発等の研究が盛んに行われている (Table 4)<sup>6,31,32</sup>。そこで、

**Table 4.** Structures and optical properties of pyronines and rhodamines.

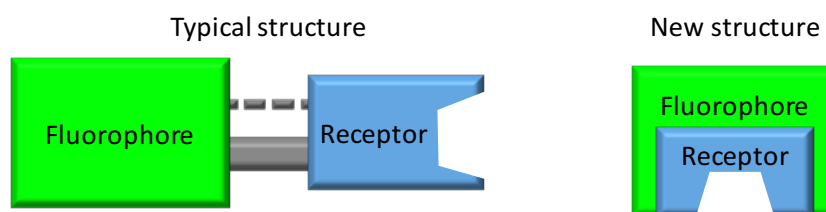
Structure	$\lambda_{\text{abs}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}$ (nm)	$\Phi$	Structure	$\lambda_{\text{abs}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}$ (nm)	$\Phi$
 O-Pyronine	547	562	0.40	 C-Rhodamine	610	637	0.46
 Si-Pyronine	634	648	0.42	 Sulfone-Rhodamine	701	733	0.70
 O-Rhodamine	549	569	0.35	 Phosphorus-Rhodamine	688	702	0.36
 Si-Rhodamine	646	660	0.31				

これらと同様に、ピロニン構造内の酸素原子をボリン酸アニオン  $[\text{R}_2\text{B}(\text{OH})_2]^-$  に変換することで、蛍光団内に分子認識部位としてホウ素を導入した新たな蛍光色素を得られると考えた (Figure 15)。このように、蛍光団内にボリン酸を導入することは、センサー分子設計の新しいアプローチとして期待できる。第 1 章で得た CyBA を含め、



**Figure 15.** Strategy of new fluorescent sensor molecule design.

従来構造のボロン酸修飾蛍光性センサー分子は、蛍光団とボロン酸部位をつなぎ、ボロン酸とポリオールとの結合に際して、B-N 結合の形成と開裂等の劇的な構造変化を利用してシグナル変化を示していた<sup>33</sup>。一方、蛍光団内にボリン酸アニオンを内包した新規構造は、ポリオールのセンシングに劇的な構造変化を必要としない蛍光性センサー分子になり得ると期待される (Figure 16)。



**Figure 16.** A typical structure and the new structure of fluorescent sensors containing boron.

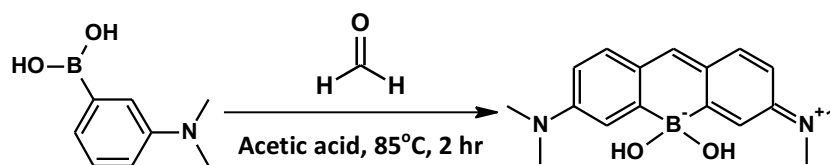
本章では、ピロニン構造内の酸素原子をボリン酸アニオンに置換した新規蛍光性センサー分子を合成し、その化学的特徴の調査とポリオール結合性及び  $\text{H}_2\text{O}_2$  反応性の評価を行った。

## 第2節 ボリン酸残基を蛍光性骨格内に有する新規蛍光色素 (JS-R) の合成<sup>34</sup>

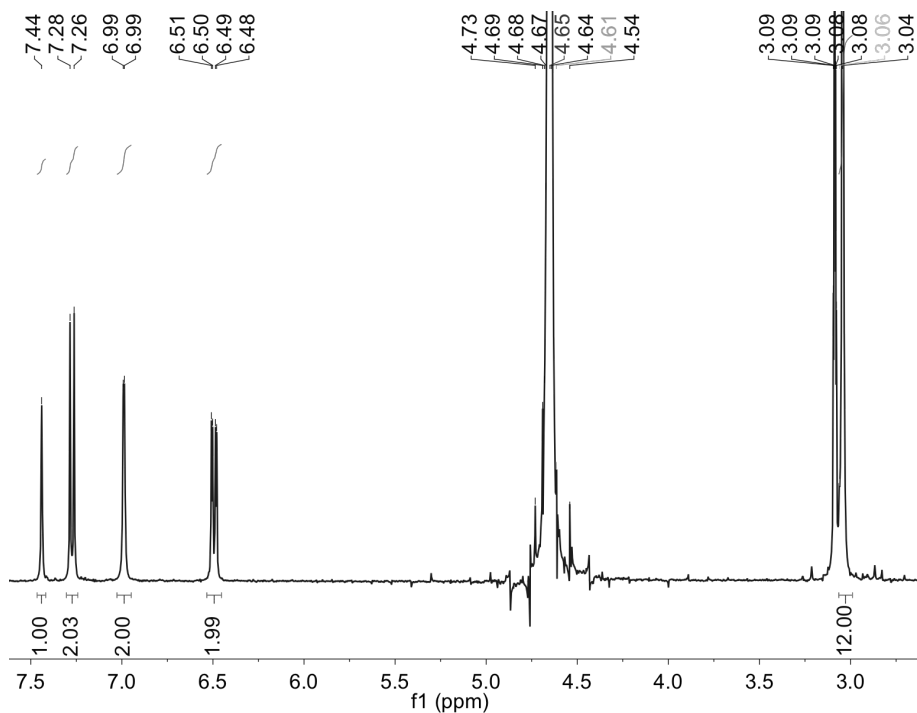
本章で合成したボリン酸を蛍光団内に有する新規蛍光性センサー分子は、単結晶 X 線構造解析によって、その構造を明らかにすることができた。単結晶 X 線構造解析は、埼玉大学大学院理工学研究科物質化学部門物質機能領域 准教授 石丸雄大 先生の御指導及び御協力の下で実施した。また、この化合物の水溶液は、赤色蛍光を発する。そこで、この化合物について、城西大学と埼玉大学、赤色蛍光から名前を取り、JoSai-Red (JS-R) と命名した。

### 2-1 JS-R の合成と構造決定

3-(*N,N*-Dimethylamino)phenylboronic acid と formaldehyde 37wt% solution を酢酸中で反応させることで JS-R を得た (Scheme 8)。得られた JS-R は、NMR、EI-MS、元素分析にて同定を行った (Figure 17)。

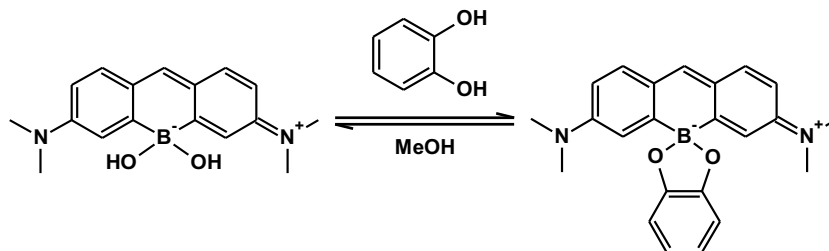


Scheme 8. Synthesis of JS-R.

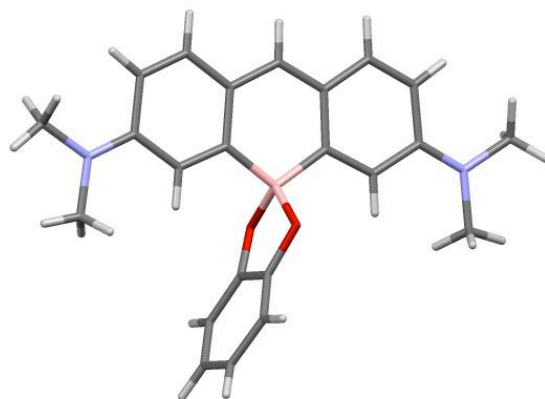


**Figure 17.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of JS-R in 25 mM phosphatebuffer/methanol- $d_4$  (2/1, v/v) at pD 7.4.

また、methanol 中に溶解した JS-R にカテコール (CA) を添加し、室温下で 48 時間静置することで JS-R/CA 複合体 (JS-R/CA) の結晶を得た (Scheme 9)。得られた JS-R/CA の結晶は、単結晶 X 線構造解析を行ったところ、ボリン酸アニオンが CA と環状エステルを形成した分子構造であることがわかった (Figure 18)。



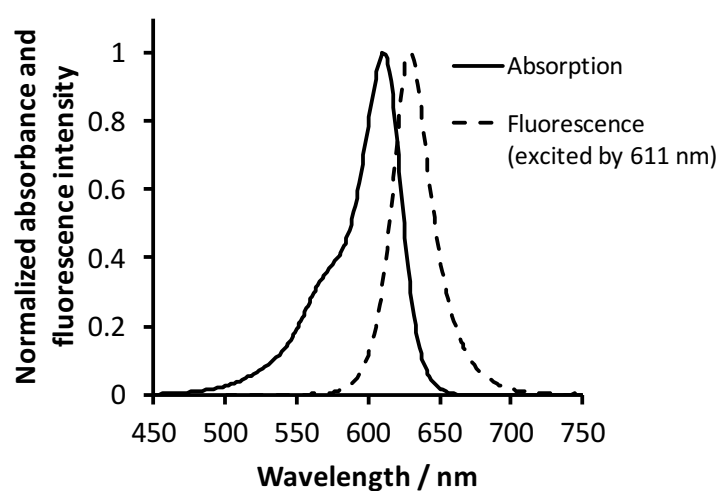
**Scheme 9.** Crystallization of JS-R/CA complex.



**Figure 18.** Crystal structure of JS-R/CA.

## 2-2 JS-R の光学特性調査

JS-R は、10 mM HEPES buffer (pH 7.4) 中において、611 nm に吸収極大を示し、モル吸光係数は  $1.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  であった。また、611 nm での励起により 630 nm に蛍光極大を示した。このことから JS-R は、Si-pyronine 同様にオリジナルである O-pyronine より長波長領域に吸収及び蛍光特性を示した (Figure 19)。更に、methanol 中における JS-R の  $\Phi$  は 0.59 であり、O-pyronine や Si-pyronine より高値を示した (Table 5)<sup>26</sup>。



**Figure 19.** Absorption and fluorescence spectra ( $\lambda_{\text{ex}}$  611 nm) of JS-R in 10 mM HEPES buffer at pH 7.4.

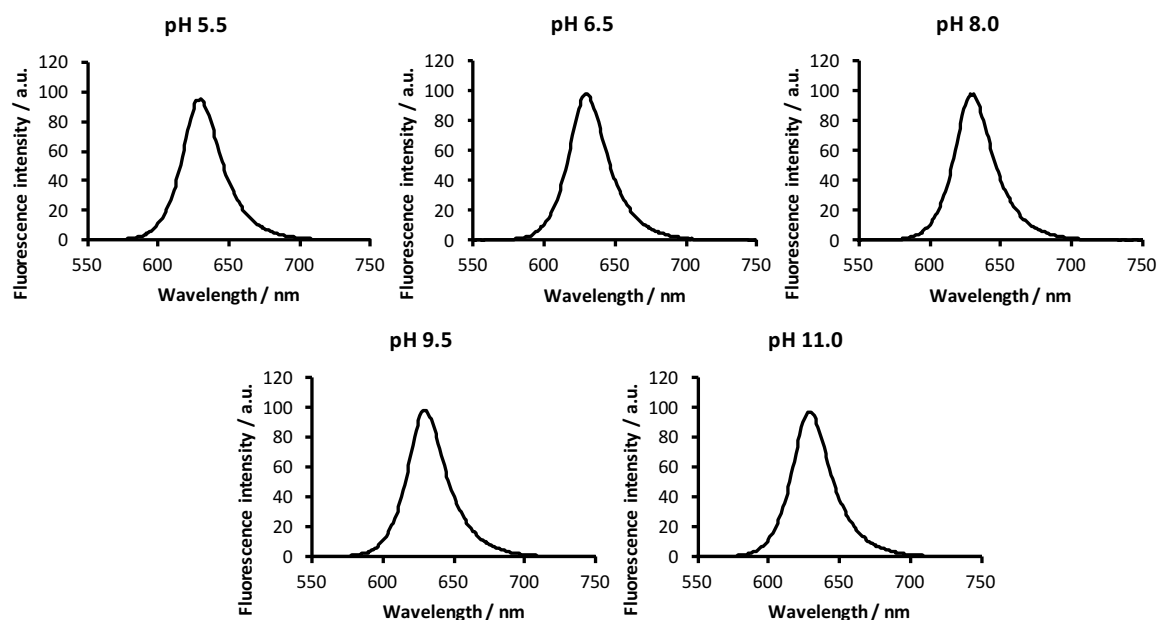
**Table 5.** Photophysical properties of pyronines.

	$\lambda_{\text{abs}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}$ (nm)	$\Phi$
<b>O-Pyronine</b> <sup>26</sup>	547	562	0.40
<b>Si-Pyronine</b> <sup>26</sup>	634	648	0.42
<b>JS-R</b>	611	630	0.59

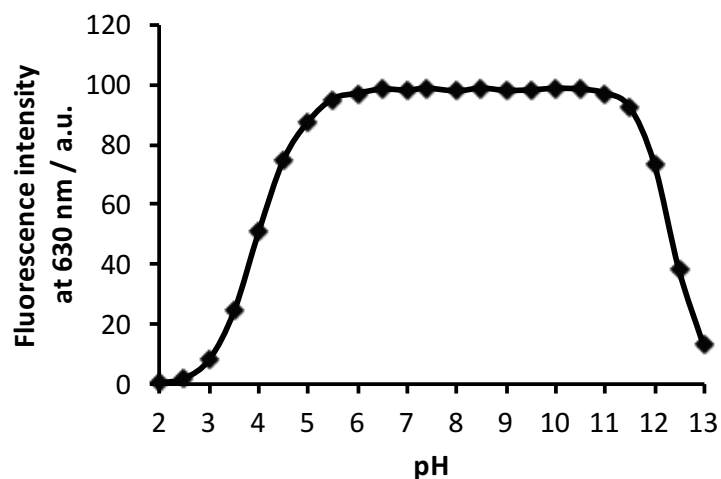


### 2-3 JS-R の pH 依存性調査

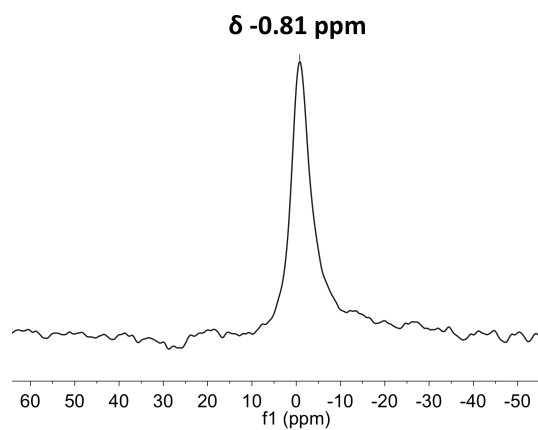
本項には、各 pH (pH 2.0-13.0) における JS-R の蛍光スペクトルの測定結果を示す。JS-R は、pH 5.5 から pH 11.0 の広範囲 pH 条件下において、一定の蛍光特性を示した (Figures 20, 21)。そのため、JS-R は pH 変化に対して安定であると言える。この広範囲 pH 条件下で安定した蛍光特性を示す JS-R の構造を理解するために、 $^{11}\text{B}$  NMR を測定した。 $^{11}\text{B}$  NMR 測定は、ホウ素の混成状態を考察可能である。一般的に  $\text{sp}^2$  混成軌道のボリン酸ホウ素は 30-60 ppm 付近、 $\text{sp}^3$  混成軌道のホウ素は 0 ppm 付近にシグナルが観察される<sup>35</sup>。JS-R は、中性条件下での  $^{11}\text{B}$  NMR スペクトルにおいて、-0.81 ppm にシグナルを示した (Figure 22)。したがって、JS-R のホウ素は中性条件下で  $\text{sp}^3$  混成軌道のボリン酸アニオンとして存在していると考えられる。以上の調査から、pH 5.5 以上の pH 条件下で JS-R のホウ素は、ボリン酸アニオンとして存在すると考えられる。また、pH 4 付近の蛍光強度変化から算出した JS-R のホウ素の  $\text{p}K_a$  は、3.99 であった (Figure 21)。



**Figure 20.** Fluorescence spectra of 6.3 μM JS-R (pH 5.5-11.0) in 10 mM HEPES buffer,  $\lambda_{\text{ex}}$  611 nm.



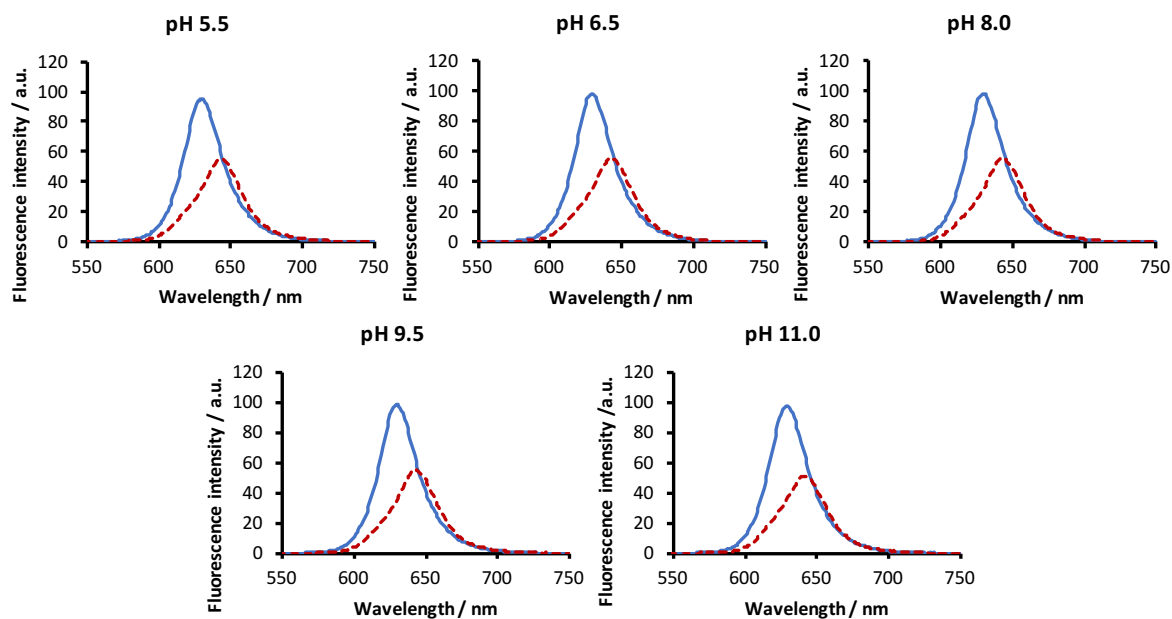
**Figure 21.** pH profile of the fluorescence intensity at 630 nm of 6.3  $\mu$ M JS-R in 10 mM HEPES buffer,  $\lambda_{\text{ex}}$  611 nm. The  $pK_a$  value of JS-R's borinic acid was 3.99.



**Figure 22.**  $^{11}\text{B}$  NMR spectrum of JS-R in 25 mM phosphate buffer/methanol- $d_4$  (2/1, v/v) at pD 7.4. Boron trifluoride diethyl etherate ( $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ ) in chloroform- $d$  was used as an external standard (0 ppm) for the  $^{11}\text{B}$  NMR.

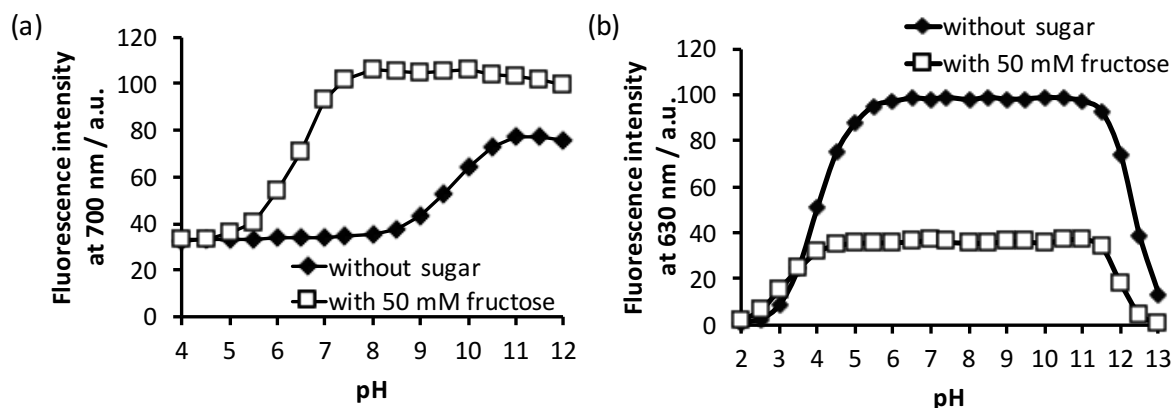
### 第3節 JS-R のポリオール結合性及び光学変化メカニズムの調査<sup>34</sup>

JS-R に 50 mM Fru を添加し、各 pH (pH 2.0-13.0) における蛍光スペクトルを測定した。50 mM Fru 共存下の JS-R は、pH 5.5 から pH 11 の広範囲 pH 条件下で、一定した蛍光スペクトルを示した (Figure 23)。



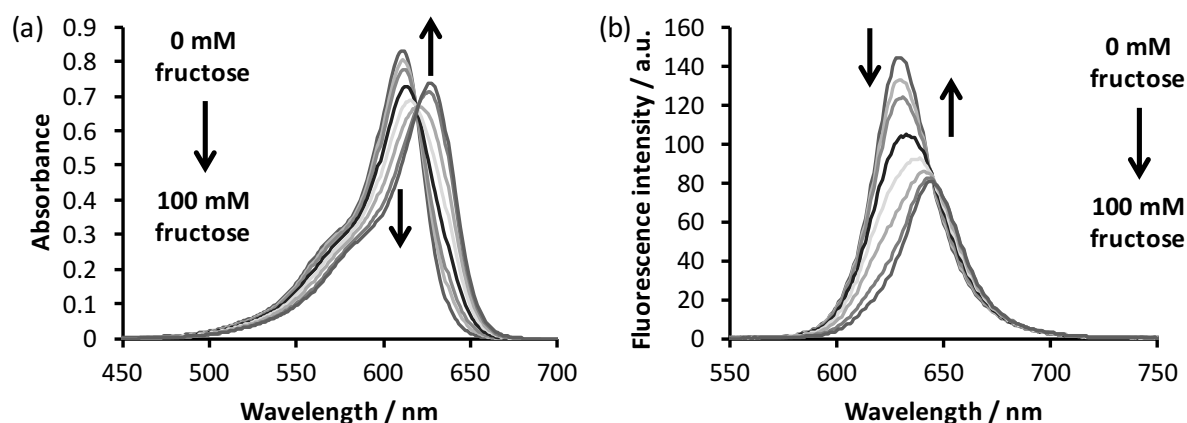
**Figure 23.** Fluorescence spectra of JS-R (6.3  $\mu$ M in 10 mM HEPES buffer,  $\lambda_{\text{ex}}$  611 nm) in various pH without sugar (blue solid line) and with 50 mM Fru (red dotted line).

第1章で得られた CyBA は、ポリオールと結合することで生じるホウ素の  $pK_a$  変化により、中性付近での蛍光変化を示した。一方、JS-R はホウ素の  $pK_a$  が 4 付近であり、pH 5.5 から pH 11.0 の pH 範囲で、糖の有無により生じた一定した蛍光変化を  $pK_a$  で説明することができない (Figure 24)。

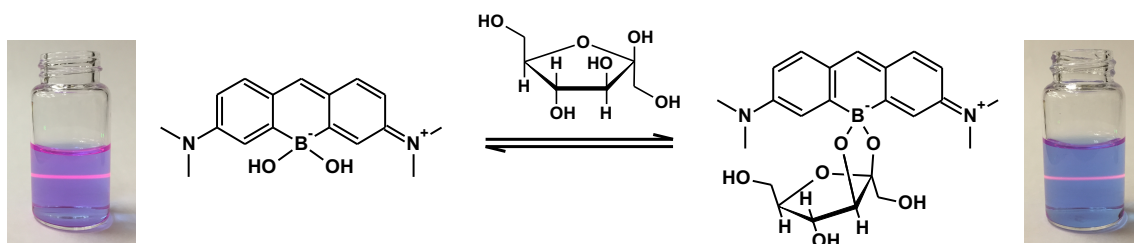


**Figure 24.** pH profile of the fluorescence intensity, (◆) without sugar, (□) with 50 mM Fru. (a) 2.0  $\mu\text{M}$  CyBA in methanol/water (1/1, v/v) containing 10 mM HEPES solution,  $\lambda_{\text{ex}}$  659 nm. (b) 6.3  $\mu\text{M}$  JS-R in 10 mM HEPES buffer,  $\lambda_{\text{ex}}$  611 nm.

Figure 24 (b) に示すような糖の有無による  $pK_a$  非依存的な JS-R の蛍光変化の違いを調査するために、各種 Fru 濃度 (0, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 mM) における JS-R の吸収及び蛍光スペクトルを測定した。中性条件下において JS-R は、611 nm に吸収極大を示し、Fru 濃度の上昇に伴い、630 nm への吸収極大の長波長変化を示した。また、JS-R は、611 nm の励起光下で Fru 濃度の上昇に伴い、蛍光極大波長の長波長変化を伴った蛍光強度の減少を示した (Figure 25)。

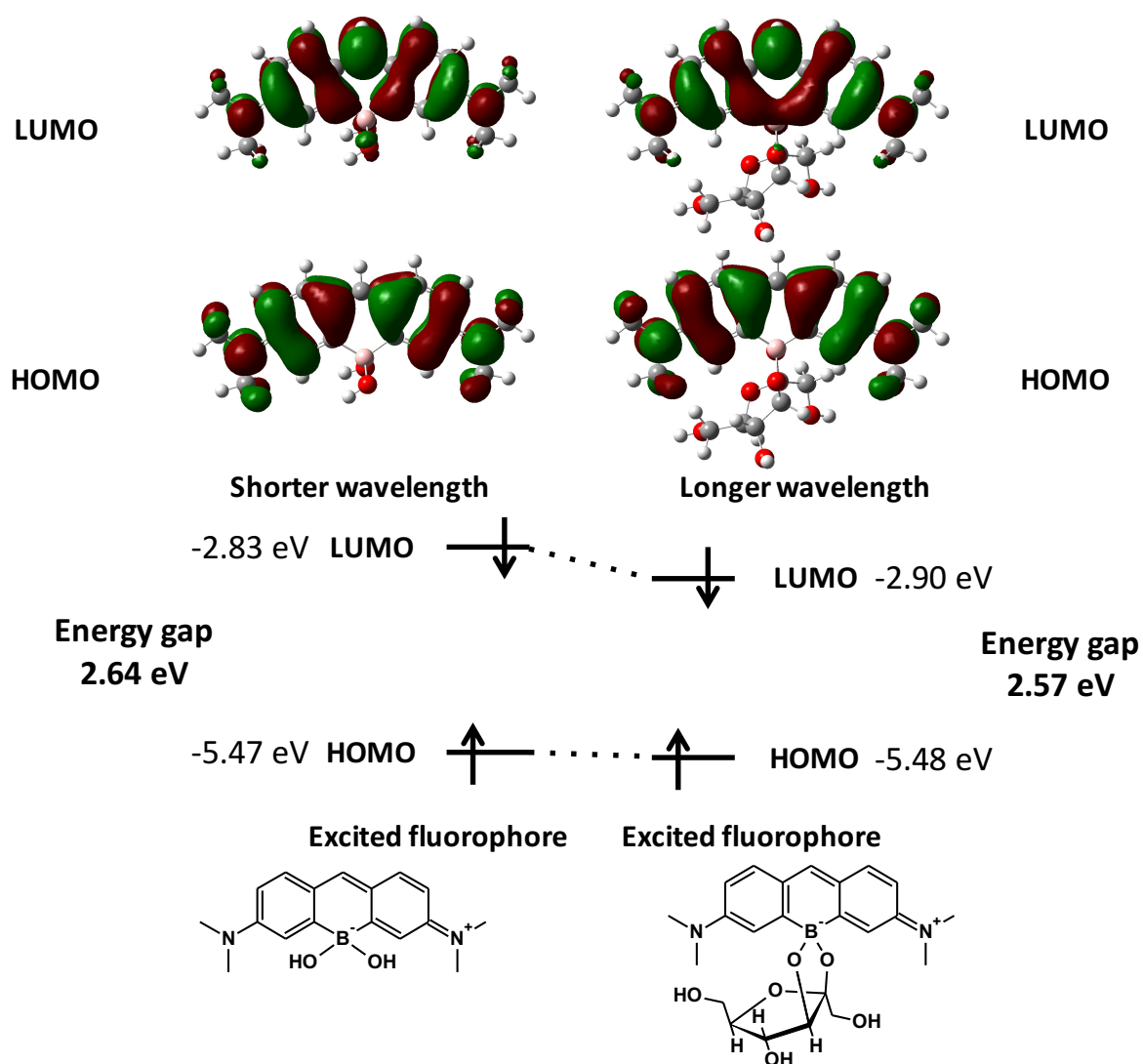


**Figure 25.** (a) Absorption spectra and (b) fluorescence spectra ( $\lambda_{\text{ex}}$  611 nm) of 6.3  $\mu\text{M}$  JS-R in 10 mM HEPES buffer at pH 7.4. The effect of concentration Fru (0-100 mM).



**Scheme 10.** Equilibrium of JS-R and Fru and aqueous buffered solutions (10 mM HEPES, pH 7.4) irradiated by 532 nm laser, the left containing 6.3  $\mu$ M JS-R and the right containing 6.3  $\mu$ M JS-R with 100 mM Fru.

JS-R のポリオール結合に伴う光学変化メカニズムを考察するために、量子化学計算プログラム (Gaussian 09) を用いた密度汎関数法 (Density functional theory: DFT, B3LYP/6-311G++(d)) による計算を行った<sup>36</sup>。JS-R 及び JS-R フルクトース複合体 (JS-R/Fru) の最高被占軌道 (Highest occupied molecular orbital: HOMO) は、ほぼ同一の分子軌道であり、そのエネルギーレベルもほとんど変化がないことが計算された。一方、最低空軌道 (Lowest unoccupied molecular orbital: LUMO) は、JS-R 及び JS-R/Fru 間の軌道及びエネルギーレベルが異なる計算結果が得られた。JS-R/Fru の LUMO では、ホウ素を跨ぐように軌道がつながっており、そのエネルギーレベルは、JS-R の LUMO (-2.83 eV) より低値 (-2.90 eV) であることが計算された。以上のことから、JS-R は、フルクトース複合体形成に伴い、LUMO の安定化が生じたと考えられる。この LUMO の安定化により、HOMO-LUMO 間のエネルギーギャップが減少する計算結果が得られた。一般的に、HOMO-LUMO 間のエネルギーギャップが小さいほど、長波長側に吸収及び蛍光極大を示す。以上のことから、JS-R は、Fru と環状エステル複合体を形成することで、HOMO-LUMO 間のエネルギーギャップが減少し、吸収極大及び蛍光極大波長の長波長移動を示したと考えられる (Figure 26)。

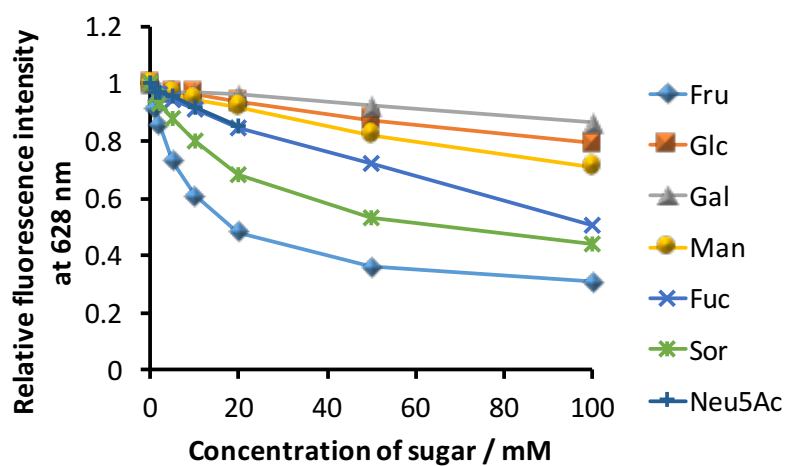


**Figure 26.** Calculated molecular orbitals and their energy level of JS-R and JS-R/Fru complex in water, DFT (B3LYP/6-311+G(d)).

また、中性条件下において、各種ポリオール (Figure 11; Fru, Glu, Gal, Man, Fuc, Sor, Neu5Ac) 濃度における JS-R の蛍光スペクトルを測定し、各種ポリオールに対する結合定数を算出した (Figure 27, Table 6)。各種ポリオール化合物に対する結合定数の比較から、JS-R は Fru に高い親和性を示すと考えられる。

**Table 6.** Binding constants of JS-R to sugars.

Sugars	Binding constants $K$ ( $M^{-1}$ )
Fru	112.1
Glc	3.3
Gal	2.3
Man	4.2
Fuc	2.4
Sor	43.3
Neu5Ac	11.2

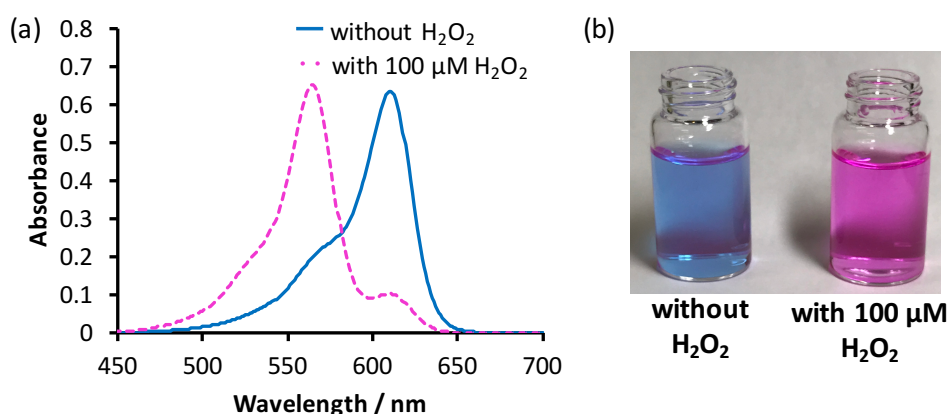


**Figure 27.** Titration curve of relative fluorescence intensity at 628 nm of JS-R (5.0  $\mu$ M in 10 mM HEPES buffer at pH 7.4,  $\lambda_{ex}$  611 nm) against sugar concentration.

## 第4節 JS-R の $\text{H}_2\text{O}_2$ 反応性の調査

### 4-1 $\text{H}_2\text{O}_2$ 反応性の調査

蛍光性ボロン酸誘導体と同様、JS-R においても、 $\text{H}_2\text{O}_2$  の有無により構造変化に基づいた蛍光変化を示すと予想した。JS-R は、pH 7.4 の緩衝液中で 611 nm に吸収極大を示し、100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  を添加することで、564 nm へ吸収極大が短波長変化し、その溶液は青色から桃色へ変化した (Figure 28)。

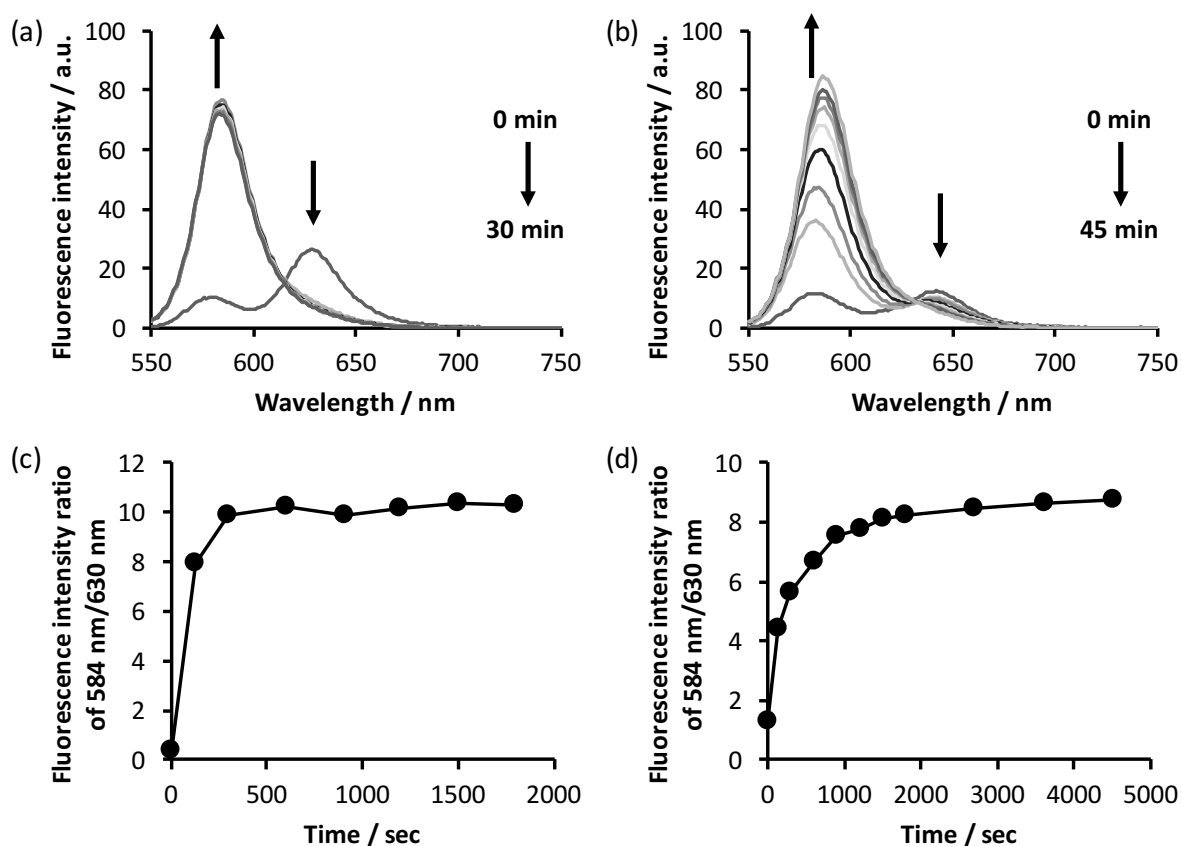


**Figure 28.** (a) Absorption spectra of 5.0  $\mu\text{M}$  JS-R in the absence and the presence of 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , measured in 10 mM HEPES buffer at pH 7.4. (b) Photograph of JS-R solution in the absence and presence of 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ .

また、Fru を含まない JS-R 溶液と予め 50 mM Fru を添加し、環状エステルを形成させた JS-R 溶液に、それぞれ 1.0 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  を添加し、蛍光スペクトルを測定した。蛍光スペクトルは、 $\text{H}_2\text{O}_2$  共存下の吸収極大波長である 564 nm を励起波長として測定した。JS-R は、Fru の有無によらず、 $\text{H}_2\text{O}_2$  共存下において、584 nm に蛍光極大を示した。Fru 非存在下では 30 分まで、Fru 存在下では 45 分まで継時的に蛍光スペクトルを測定すると、JS-R は Fru 非存在下の方が速やかな変化を示した (Figure 29a, b)。JS-R の蛍光極大波長である 630 nm と  $\text{H}_2\text{O}_2$  共存下の蛍光極大波長である 584 nm における蛍光強度を比 ( $FI_{584\text{ nm}}/FI_{630\text{ nm}}$ ) として、時間に対してプロットすると、Figure 29c, d のようになった。Fru 非存在下では 300 秒で蛍光変化が一定となり、Fru 存在下では時間に依存した蛍光変化を示し、1800 秒で蛍光変化が一定となった。蛍光変化が一定

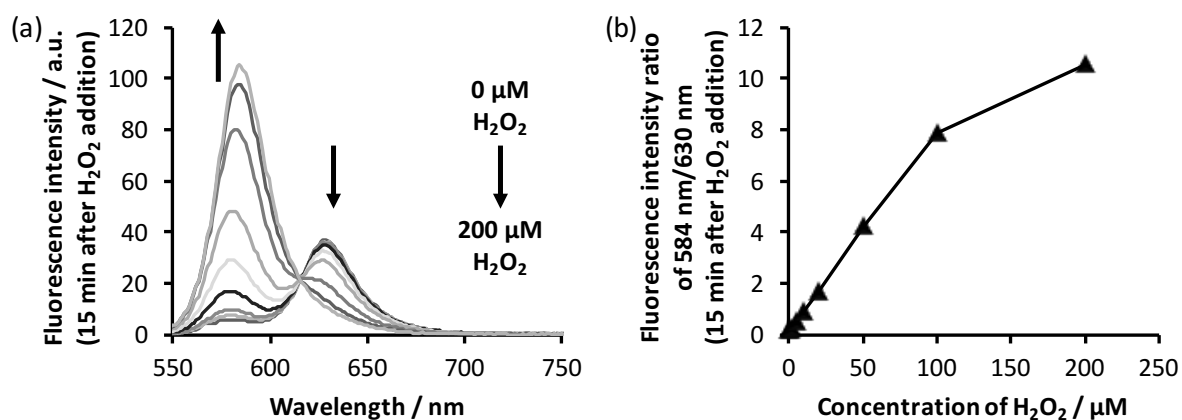


になった時、JS-R 及び環状エステルを形成した JS-R と  $\text{H}_2\text{O}_2$  との反応が終了したと考えられる。



**Figure 29.** Time dependence of fluorescence spectral changes of  $5.0 \mu\text{M}$  JS-R upon adding  $1.0 \text{ mM}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , (a) JS-R without Fru, (b) JS-R with  $50 \text{ mM}$  Fru. Plots of fluorescence intensity ratio of  $584 \text{ nm}/630 \text{ nm}$  of  $5.0 \mu\text{M}$  JS-R upon addition of  $1.0 \text{ mM}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , (c) JS-R without Fru, (d) JS-R with  $50 \text{ mM}$  Fru. All samples were measured in  $10 \text{ mM}$  HEPES solution at  $\text{pH } 7.4$ ,  $\lambda_{\text{ex}} 564 \text{ nm}$ .

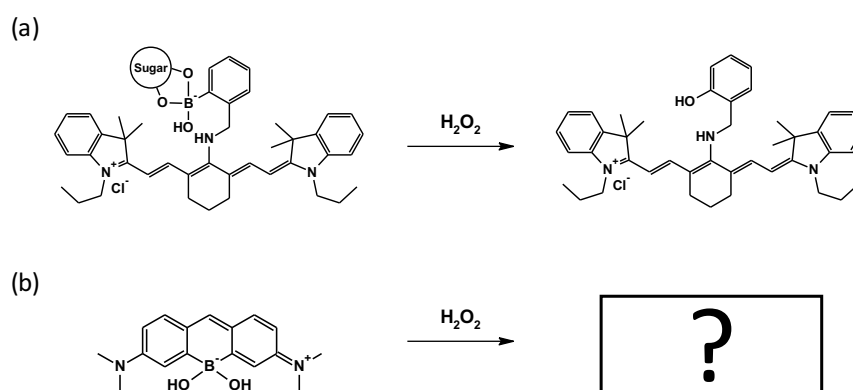
$\text{H}_2\text{O}_2$  と素早く反応した環状エステルを形成していない JS-R について、各種  $\text{H}_2\text{O}_2$  濃度における蛍光スペクトルを  $\text{H}_2\text{O}_2$  添加 15 分後に測定した。JS-R は、 $\text{H}_2\text{O}_2$  濃度の上昇に伴い、蛍光極大の短波長変化を示した。また、 $584 \text{ nm}$  と  $630 \text{ nm}$  の蛍光強度比を  $\text{H}_2\text{O}_2$  濃度に対してプロットすると、 $0 \mu\text{M}$  から  $100 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  濃度範囲で、直線性を示すことがわかった (Figure 30)。



**Figure 30.** Fluorescence spectra (a) and titration curve concentration of  $\text{H}_2\text{O}_2$  vs. fluorescence intensity ratio of 584 nm/630 nm (b) of 5.0  $\mu\text{M}$  JS-R without Fru 15 minutes after  $\text{H}_2\text{O}_2$  addition, measured in 10 mM HEPES buffer at pH 7.4,  $\lambda_{\text{ex}}$  564 nm.

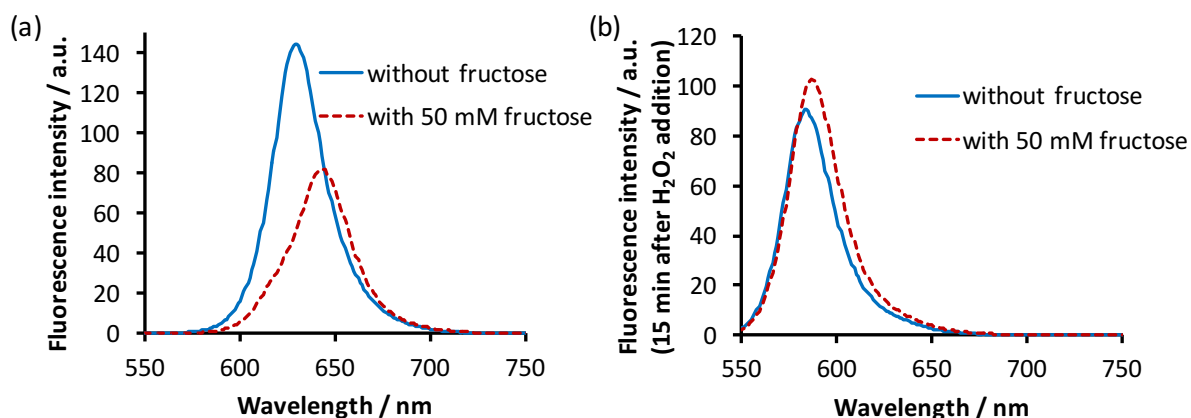
#### 4-2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> との反応後の生成物の調査

第 1 章の調査により、環状エステルを形成した CyBA は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> との反応により、ボロン酸残基とヒドロキシ基の置換反応が生じたと予測される (Figure 31a)。一方、JS-R に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を添加した際の蛍光スペクトル変化は、構造変化に基づいたものと推察されるが、その反応生成物の構造は不明である (Figure 31b)。

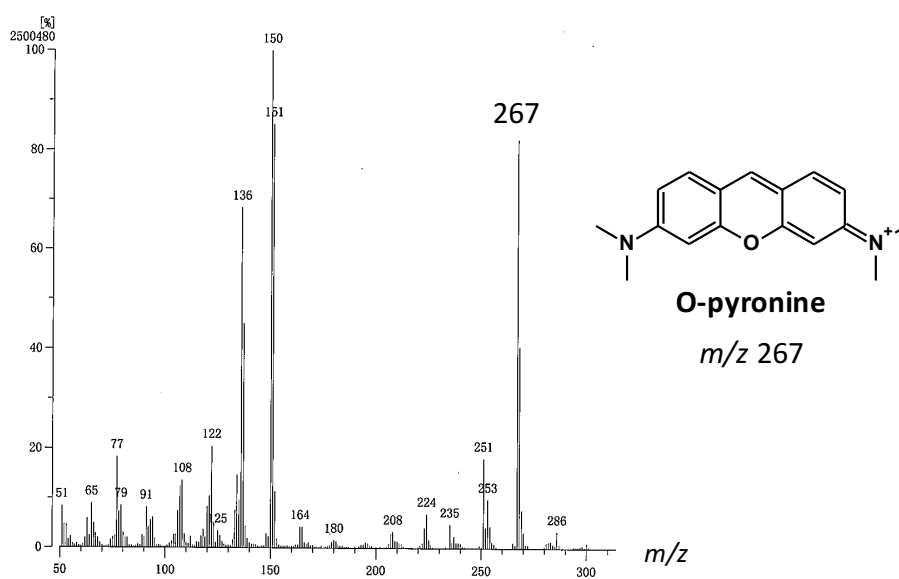


**Figure 31.** (a) Proposed structural change of CyBA cyclic ester by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (b) Unknown structural change of JS-R reacted with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

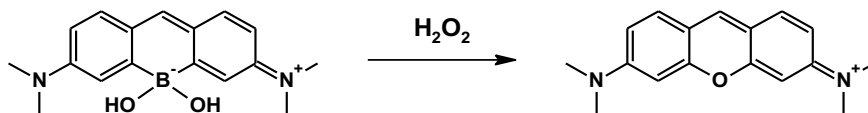
そこで、JS-R と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> との反応生成物が、ポリオール結合能を保持しているか否かを検討した。JS-R は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 不在下において、Fru と結合することで、蛍光強度の減少と蛍光極大の長波長変化を示す (Figure 32a)。一方、予め 1.0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で処理した JS-R は、Fru を添加した際に、蛍光強度の減少と蛍光極大の長波長変化を確認できなかった (Figure 32b)。このことから、JS-R と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> との反応生成物は、ポリオール結合能を失っていると推察される。そこで、反応生成物の構造について、EI-MS (高分解能質量分析) による構造解析を実施した。反応生成物の分子イオンピーク (267.1498 *m/z*) は、O-pyronine ( $\lambda_{\text{ex}}$  547 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  562 nm) の分子イオンピーク理論値 (267.1497 *m/z*) と一致した (Figure 33)。このことから、JS-R は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と反応することで、O-pyronine に変換されたと考えられる (Scheme 11)。すなわち、この構造変化が蛍光極大の短波長変化をもたらしたと考えられる。



**Figure 32.** Fluorescence spectra of JS-R (5.0 μM in 10 mM HEPES buffer at pH 7.4) in the absence and presence of 50 mM Fru. (a) JS-R without addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, λ<sub>ex</sub> 611 nm. (b) JS-R pretreated with 1.0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (15 minutes after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> addition), λ<sub>ex</sub> 564 nm.



**Figure 33.** EI-MS of JS-R treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Scheme 11.** Proposed structural change of JS-R reacted with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## 第5節 小括

本章では、ローダミン類の蛍光団であるピロニン構造内の酸素原子をボリン酸アニオンに変えた新規蛍光性センサー分子 JS-R を得ることができた。Table 7 にその特徴の要約を示す。JS-R は、 $\Phi$  が 0.59 と高値を示し、広範囲の pH 条件下で安定した光学特性 ( $\lambda_{\text{abs}}$  611 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  630 nm) を示した。このことから、JS-R は若干の pH 変化が生じる環境下でも、蛍光性センサーとしての応答が期待できる。また、Fru に対して高い結合性を示し、環状エステルの形成により蛍光強度の減少と蛍光極大の長波長変化を示した。これは、環状エステルを形成することで、LUMO のエネルギーレベルが低下し、それに伴って HOMO-LUMO 間のエネルギーギャップが減少することで、吸収極大及び蛍光極大の長波長変化をもたらしたと計算結果から考察された。また、環状エステル形成時の蛍光強度の減少は、蛍光量子収率の低下によるものと考えられる。更に、JS-R は、環状エステル形成の有無によらず、 $\text{H}_2\text{O}_2$  に対する反応性を示した。

**Table 7.** Characters as fluorescent dye of JS-R.

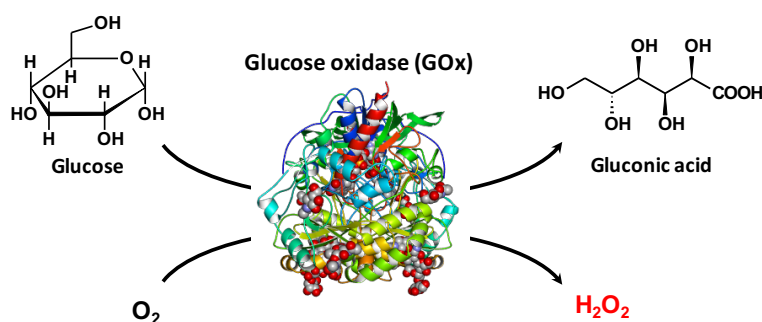
JS-Rの蛍光色素としての性質
高い蛍光量子収率を示す。 ( $\Phi$ 0.59)
長波長可視領域 ( $\lambda_{\text{ex}}$ 611 nm, $\lambda_{\text{em}}$ 630 nm) に光学特性を示す。
pH 4付近及びpH 12付近のpH条件下で蛍光変化する。
pH 5.5からpH 11の広範囲で安定した蛍光変化を示す。
Fruに高い結合性を示す。
環状エステルの形成に伴い、蛍光強度が減少する。
環状エステルの形成に伴い、蛍光極大が長波長変化する。
環状エステルの有無に関わらず、 $\text{H}_2\text{O}_2$ の刺激により反応性を示す。

### 第3章: CyBA 及び JS-R の適用に関する検討

#### 第1節 小緒言

様々な内的及び外的要因により、生体内酸化ストレスの蓄積が亢進すると、糖尿病やそれに伴う腎機能の低下や視神経、末梢神経障害の合併症、心筋梗塞や脳卒中などの循環器疾患、認知症、癌の発症リスクが高まる<sup>37,38,39</sup>。これらの疾患に伴い、生体内グルコース濃度の上昇、細胞の糖鎖合成の変化、及びタンパク質の糖化反応亢進が生じる。これらは、糖の存在を直接的に検出するか、あるいは糖が関わる生化学反応を間接的に検出できる蛍光性センサー分子を用いることで調査可能になると期待される。

Glc は、酸素共存下でグルコースオキシダーゼ (GOx) と特異的に反応し、グルコン酸と  $\text{H}_2\text{O}_2$  を生成する (Scheme 12)<sup>40,41</sup>。このような酵素反応は、電気化学的方法や呈色法によるグルコースセンサーに利用されてきた。GOx の酵素反応で生成される  $\text{H}_2\text{O}_2$  を認識することによる Glc 濃度の蛍光測定も行われてきた<sup>42,43</sup>。



Scheme 12. Reaction scheme of Glc and GOx.

悪性腫瘍では、シアル酸の総量が増加し、糖鎖の結合様式の変化が顕著に起こる<sup>44</sup>。そのため、シアル酸を認識することは、癌細胞検出に有用であると考えられる。

また、糖化反応を受けたタンパク質の一部は、検査及び診断のマーカーとして利用される。例として、糖化ヘモグロビン ( $\text{HbA}_{1c}$ ) や糖化アルブミンは、それぞれ3ヶ月及び2週間の血糖状態を知ることができる<sup>41</sup>。また、糖化タンパク質の一つである  $\alpha$

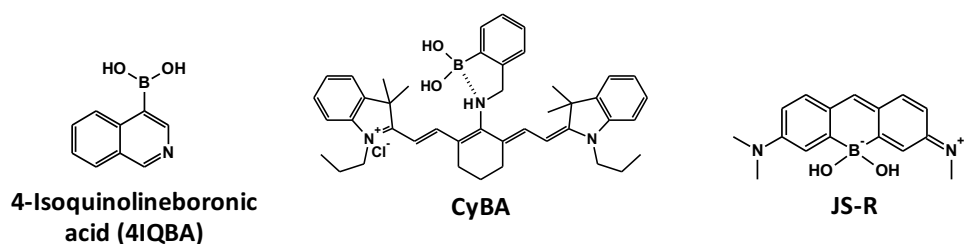
フェトプロテインは肝癌の診断マーカーとして知られている<sup>45,46</sup>。

本章では、CyBA と JS-R の特徴を基に、適用に関する検討を行った。

## 第2節 CyBA、JS-R のポリオール結合特性及び H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 反応性の比較

### 2-1 糖選択性の比較

本項には、CyBA 及び JS-R の糖結合性及び糖選択性を比較するために、比較対照試薬、CyBA、JS-R の Fru、Glc、Neu5Ac に対する結合定数の比較を示す。比較対照試薬としては、蛍光変化による糖応答性を示すボロン酸誘導体として報告されている 4-isoquinolineboronic acid (4IQBA) を用いた (Figure 34)<sup>47</sup>。いずれの蛍光性分子においても Fru に対して高い結合定数を示した。興味深いことに、CyBA は、Neu5Ac に対する結合定数が 4IQBA 及び JS-R と比較して高いことがわかった (Table 8)。そこで、各種蛍光性分子の Glc に対する結合定数と Neu5Ac に対する結合定数をそれぞれ Fru に対する結合定数で比をとり、糖選択性の比較を行った。CyBA は、Neu5Ac に対する選択性 (Neu5Ac/Fru) が 4IQBA の約 16 倍、JS-R の約 8 倍高いことがわかった (Table 9)。



**Figure 34.** Chemical structures of 4IQBA, CyBA and JS-R.

**Table 8.** Binding constants  $K$  ( $M^{-1}$ ) of 4IQBA, CyBA and JS-R.

	4IQBA	CyBA	JS-R
Fru	1794.1	173.2	112.1
Glc	207.5	4.0	3.3
Neu5Ac	87.0	135.4	11.2

**Table 9.** The ratios of binding constant in Table 8.

	4IQBA	CyBA	JS-R
Glc/Fru	0.1157	0.023	0.029
Neu5Ac/Fru	0.0485	0.78	0.10



## 2-2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 反応性の比較

本項には、JS-R 及び CyBA の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に対する反応性の比較を示す。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 反応性を比較するために、Figure 29c, d 及び Figure 14b の実験結果を基に片対数プロットを作成し、反応速度定数 ( $k$ ) を算出した。環状エステルを形成していない JS-R 及び Fru と環状エステルを形成した JS-R は、584 nm と 630 nm の蛍光強度比 ( $F_R$ ) を求め、蛍光強度比の最大値 ( $F_{Rlim}$ ) から差 ( $F_{Rlim} - F_R$ ) を算出し、これを自然対数とし、時間に対して片対数プロットをとることで直線化した (Figure 35a, b)。この時、[JS-R]  $\ll$  [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] (5.0  $\mu$ M JS-R, 1.0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) であることから、擬 1 次反応とみなして直線の傾きから  $k$  ( $s^{-1}$ ) を算出した。(式 1, 2, Table 10)

$$F_R = F_{Rlim}(1 - e^{-kt}) \quad \cdots \text{(式 1)}$$

$$\ln(F_{Rlim} - F_R) = -kt + \ln F_{Rlim} \quad \cdots \text{(式 2)}$$

$F_R$ ; 584 nm と 630 nm から求めた蛍光強度比 ( $F.I._{584\text{ nm}}/F.I._{630\text{ nm}}$ )、 $F_{Rlim}$ ; 蛍光強度比 ( $F.I._{584\text{ nm}}/F.I._{630\text{ nm}}$ ) の最大値、 $k$ ; 反応速度定数 ( $s^{-1}$ )、 $t$ ; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加後の経過時間 (s)

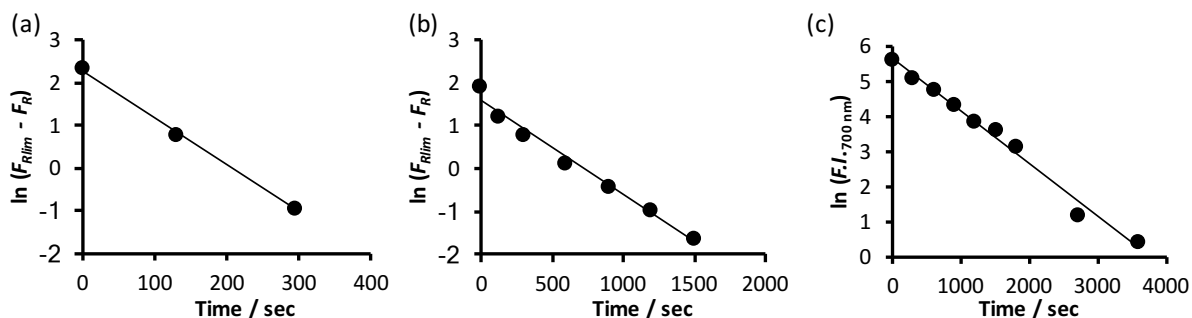
また、Fru と環状エステルを形成した CyBA は、700 nm の蛍光強度 ( $F.I._{700\text{ nm}}$ ) を自然対数とし、時間に対して片対数プロットをとり、直線化した (Figure 35c)。この時、[CyBA]  $\ll$  [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] (2.0  $\mu$ M CyBA, 1.0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) であることから、擬 1 次反応とみなして直線の傾きから反応速度定数  $k$  ( $s^{-1}$ ) を算出した (式 3, 4, Table 10)。

$$F.I. = F.I._0 e^{-kt} \quad \cdots \text{(式 3)}$$

$$\ln F.I. = -kt + \ln F.I._0 \quad \cdots \text{(式 4)}$$

$F.I.$ ; 700 nm における蛍光強度、 $F.I._0$ ; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加 0 分の 700 nm における蛍光強度、 $k$ ; 反応速度定数 ( $s^{-1}$ )、 $t$ ; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加後の経過時間 (s)

Fru 非存在下における JS-R の反応速度定数が最も高い値を示したことから、環状エステルを形成していない JS-R は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に対する反応性が高いことがわかった。



**Figure 35.** Kinetic plots of fluorescence intensity or fluorescence intensity ratio of the pseudo-first order reaction of new fluorescent sensors to  $H_2O_2$  (1.0 mM). (a) JS-R (5.0  $\mu$ M) without Fru, (b) JS-R (5.0  $\mu$ M) with Fru (50 mM) and (c) CyBA (2.0  $\mu$ M) with Fru (50 mM).

**Table 10.** Reaction rate constants  $k$  ( $s^{-1}$ ) of 4IQBA, CyBA and JS-R with  $H_2O_2$ .

Reaction constants $k$ ( $s^{-1}$ )	
CyBA without Fru	-
CyBA with 50 mM Fru	$1.50 \times 10^{-3}$
JS-R without Fru	$1.11 \times 10^{-2}$
JS-R with 50 mM Fru	$1.90 \times 10^{-3}$

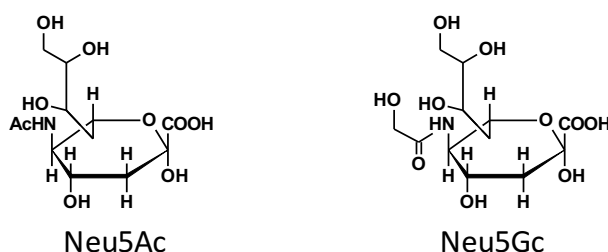
これまでの検討から、CyBAはNeu5Acに対する選択性が高く、近赤外領域で光学特性変化を示す特徴を有することがわかった。また、JS-Rは $H_2O_2$ と素早く反応し、高感度に $H_2O_2$ の検出が可能であることがわかった (Table 11, Figure 30)。そこで、本章第3節及び第4節では、これらの特徴を基に、各蛍光性センサー分子の適用について検討した結果について論述する。

**Table 11.** Summary of CyBA and JS-R properties.

CyBA	蛍光性センサー分子に求められる性質	JS-R
-	高い蛍光量子収率を示す。	$\Phi$ 0.59
$\lambda_{\text{abs}}$ 659 nm, $\lambda_{\text{em}}$ 726 nm	近赤外領域 (生体の窓: 650-900 nm) に光学特性を示す。	-
-	特定のpH領域で蛍光変化を示す。	-
-	広いpH範囲で安定した蛍光特性を示す。	pH 5.5~pH 11
Neu5Ac 選択性高	特定の分子に対して特異的に結合する。	-
蛍光増大	特定の分子認識において蛍光強度変化を示す。	蛍光減少
短波長変化	特定の分子認識において蛍光波長変化を示す。	長波長変化
-	物理化学的に安定性が高い。	-
-	特定の刺激により安定性が変化する。	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

### 第3節 CyBA の *in vivo* 蛍光イメージングへの適用の検討

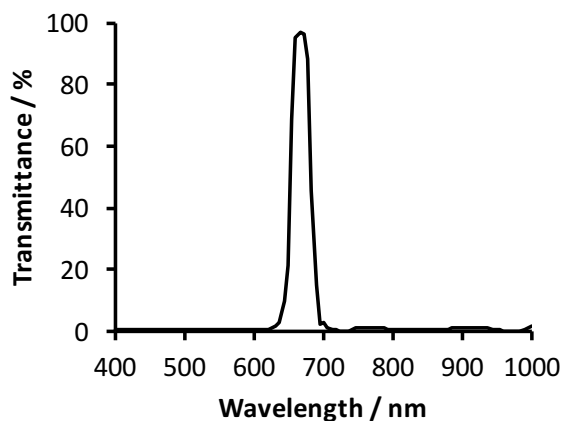
今日までの糖鎖研究により、複合糖質、糖タンパク質、糖脂質等が多彩な生理学的機能に重要な役割を担っていることが明らかにされてきた。シアル酸は、糖鎖機能の劇的な変化に関わっている。現在では、最も代表的なシアル酸である Neu5Ac や *N*-グリコリルノイラミン酸 (Neu5Gc) をはじめ (Figure 36)、50 種以上のシアル酸ファミリーが知られている。Neu5Ac は、大部分のシアル酸の共通構造であり、細胞表面に存在する複合糖質、糖タンパク質、糖脂質の糖鎖に含まれている<sup>44,48</sup>。一部の癌細胞では、シアル酸を過剰に発現していることが知られており、シアル酸認識を利用した癌細胞イメージングや癌細胞ターゲティングに関する研究が報告されている<sup>44,49,50</sup>。



**Figure 36.** Structures of major sialic acids (Neu5Ac and *N*-glycolylneuraminic acid: Neu5Gc).

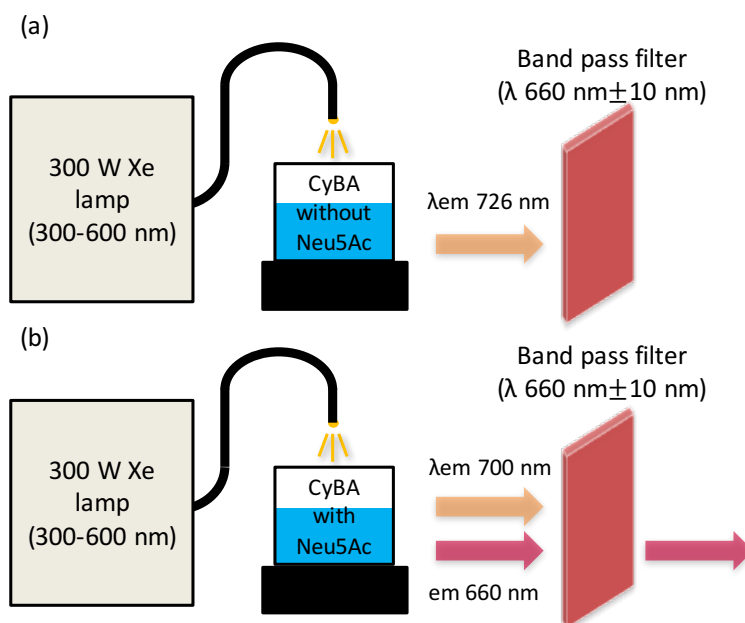
CyBA は Neu5Ac に対する選択性が高く、近赤外領域で光学特性変化を示す特徴を有する。そのため、CyBA は細胞の糖鎖認識に基づく *in vivo* 蛍光イメージングへの適用が期待される。

本節では、糖鎖を構成する重要な糖類である Neu5Ac の蛍光イメージングに関する検討を行った。その検討に際して、生体の窓の波長領域に透過特性を示すバンドパスフィルターを使用し、蛍光像を得る実験系を構築した (Figures 1 and 37)。この実験系では、300-600 nm の光を発するキセノン光源 (300 W) を CyBA 溶液に照射し、Neu5Ac の有無でコントラストの異なる蛍光像が、バンドパスフィルターを介して観察できると予想される (Scheme 13)。



**Figure 37.** Transmission spectrum of 660 nm band pass filter.

Neu5Ac 不在下の CyBA 溶液は、蛍光は確認できなかった。一方、30 mM Neu5Ac 共存下の CyBA 溶液では、明瞭な蛍光像が観察された (Figure 38)。このことから、バンドパスフィルターを介して蛍光像を観察するこの実験系の有効性を確認できた。



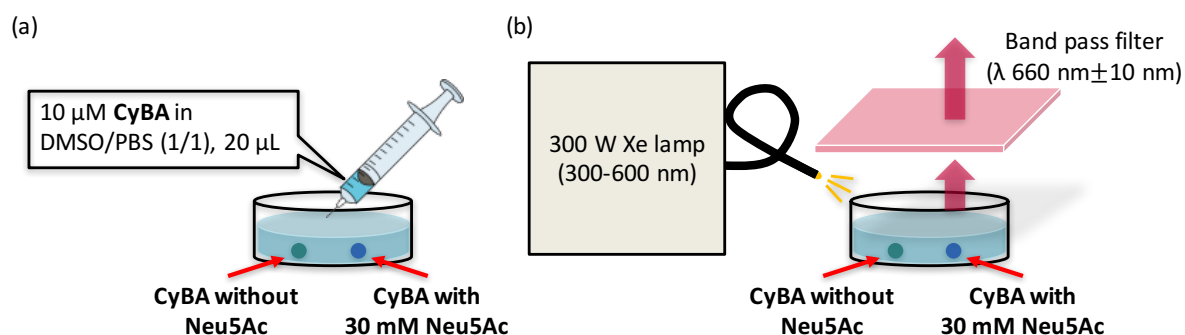
**Scheme 13.** Evaluation system of fluorescence image of JS-R (10  $\mu$ M in PBS containing 50% DMSO solution at pH 7.4) in the absence (a) and presence (b) of 30 mM Neu5Ac, using band pass filter (660 nm  $\pm$  10 nm).



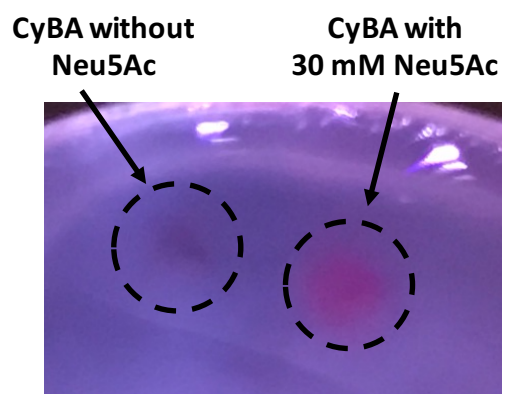
**CyBA without Neu5Ac**      **CyBA with 30 mM Neu5Ac**

**Figure 38.** Fluorescence image of 10  $\mu\text{M}$  CyBA in PBS containing 50% DMSO solution, (left) CyBA without Neu5Ac, (right) CyBA with 30 mM Neu5Ac.

次に、polyvinyl alcohol (PVA) ゲルを模擬的な組織とし、組織内に注入した CyBA の蛍光像について、Scheme 14 に示す実験系を用いて観察した。この実験系においても、660 nm に選択的な透過特性を示すバンドパスフィルターを用いて評価を行った。溶液中と同様に、PVA ゲル中においても Neu5Ac 不在下における CyBA の無蛍光像と、Neu5Ac が結合した CyBA の蛍光像を観察することができた (Figure 39)。以上のことから、CyBA は細胞糖鎖の Neu5Ac への結合と、それがもたらす蛍光増大に基づく *in vivo* 蛍光イメージングへの適用が期待できる。



**Scheme 14.** Preparation of 5% polyvinyl alcohol (PVA) gel containing 10  $\mu\text{M}$  CyBA without and with 30 mM Neu5Ac in PBS containing 50% DMSO solution at pH 7.4 (a). Evaluation system of fluorescence image of 10  $\mu\text{M}$  CyBA without and with 30 mM Neu5Ac in 5% PVA gel, using band pass optical filter (660 nm  $\pm$  10 nm) (b).

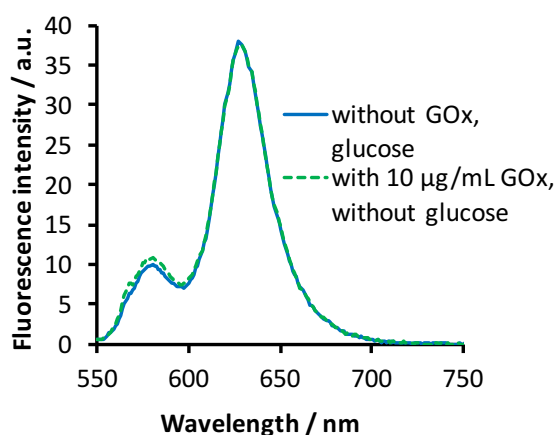


**Figure 39.** Fluorescence image of 10  $\mu\text{M}$  CyBA in the absence and presence of 30 mM Neu5Ac in 5% PVA gel.

#### 第4節 JS-R の GOx を組み合わせたグルコースセンサーへの適用の検討

第2章第4節及び、第3章第2節で、環状エステルを形成していない JS-R は、 $\text{H}_2\text{O}_2$  との反応性に優れていることを示した。このことは、JS-R が  $\text{H}_2\text{O}_2$  を検出することに基づくバイオセンシングへの適用を期待させる。本節には、JS-R を用いて、グルコースオキシダーゼ (GOx) の酵素反応で生成される  $\text{H}_2\text{O}_2$  を検出することに基づいたグルコースセンサーへの適用を検討した結果を示す (Scheme 12)。

コントロールとして、Glc 不在下において GOx の有無で JS-R の蛍光スペクトルを測定した。JS-R は、Glc 不在下において、GOx 添加に伴う蛍光スペクトル変化を示さないことが確認された (Figure 40)。したがって、JS-R は GOx と直接反応しないことが確認できた。



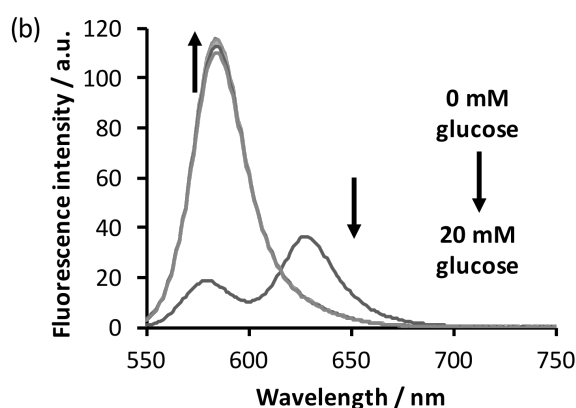
**Figure 40.** Fluorescence spectra of 5.0  $\mu\text{M}$  JS-R without Glc solution in the absence and presence of 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  GOx, measured in 10 mM HEPES buffer at pH 7.4,  $\lambda_{\text{ex}}$  564 nm.

次に、各種 Glc 濃度 (0, 1, 2, 5, 10, 20 mM) における GOx 共存下の JS-R の蛍光スペクトルを測定した。蛍光スペクトル測定は、Glc 添加 15 分後に行った。Glc の添加により、JS-R の蛍光極大が 629 nm から 584 nm へ短波長変化を示した (Figure 41)。この変化は、JS-R に直接  $\text{H}_2\text{O}_2$  を添加した際と同様の蛍光スペクトル変化であった (Figure 28, Scheme 11)。したがって、Figure 41 で観察された蛍光スペクトル変化は、Glc と GOx との反応により生成した  $\text{H}_2\text{O}_2$  と JS-R が反応し、O-pyronine に構造変化し

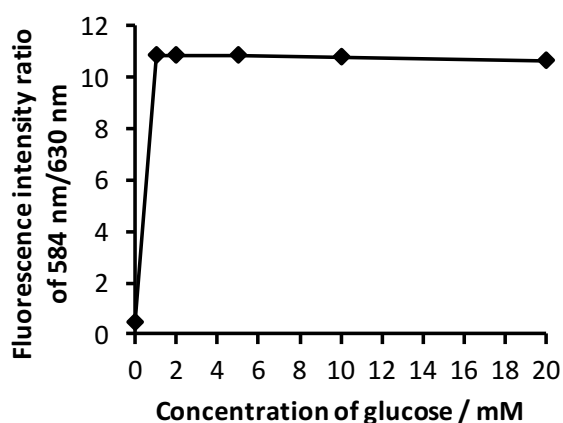


たことによると考えられる。584 nm の蛍光強度は、1.0-20 mM の Glc 濃度でほぼ一定の強度を示し、蛍光強度比 ( $FI_{584\text{ nm}}/FI_{630\text{ nm}}$ ) は約 11 で一定値を示した (Figure 42)。これは、JS-R が Glc 1.0 mM の低濃度条件下であっても  $\text{H}_2\text{O}_2$  を高感度に検出できることを示している。すなわち、低濃度の Glc から生成された  $\text{H}_2\text{O}_2$  によって JS-R が全て分解され、O-pyronine に変換されたと考えられる (Scheme 15)。

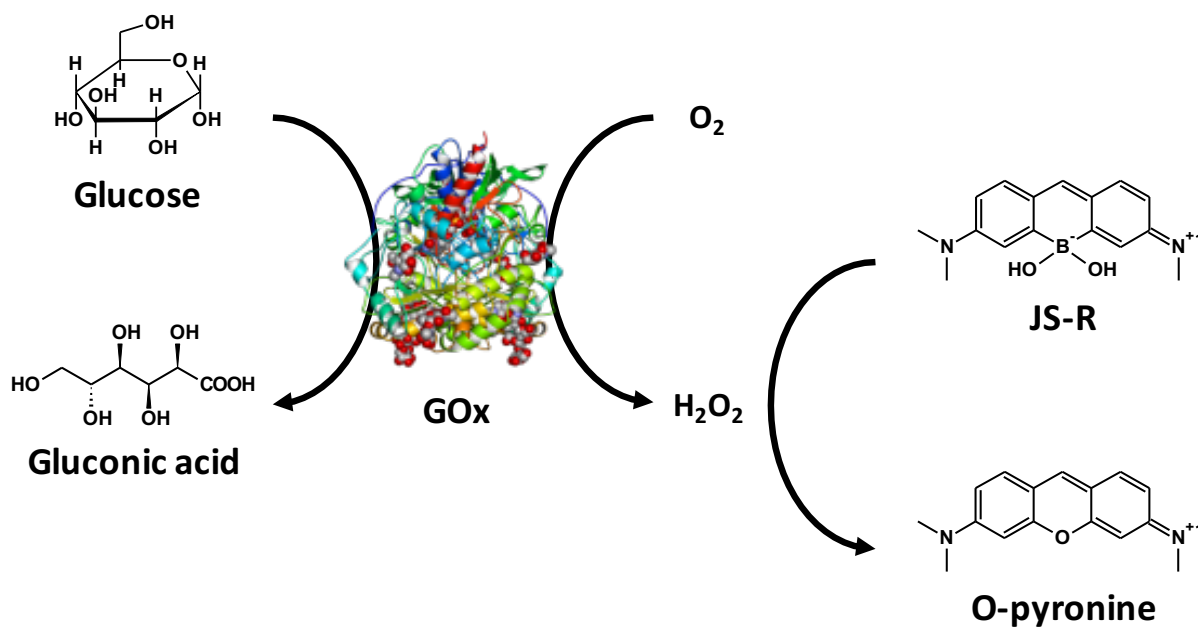
GOx を利用した一般的な Glc 測定キットは、1 単位あるいは 2 単位の GOx が含まれており、Glc 濃度 1-33 mM (20-600 mg/dL) の濃度範囲で測定可能である。本節で用いた GOx の濃度 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  は、概ね 1 単位に相当しており、酵素量として十分であると考えられる。また、JS-R 濃度においては、JS-R 濃度 5  $\mu\text{M}$  で Glc の高感度検出が可能であるが、臨床で利用される Glc 濃度範囲内での Glc 濃度測定には適さない。JS-R と GOx を組み合わせて血中 Glc 濃度測定を行うためには、JS-R 濃度及び GOx 濃度等の最適化を行う必要があると考えられる。



**Figure 41.** Fluorescence spectra of 5.0  $\mu\text{M}$  JS-R containing 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  GOx solution upon addition of Glc (0, 1, 2, 5, 10, 20 mM) in 10 mM HEPES buffer at pH 7.4,  $\lambda_{\text{ex}}$  564 nm.



**Figure 42.** Fluorescence intensity ratio of 584 nm/630 nm vs. concentration of Glc (0-20 mM) plot, measured in 5.0  $\mu$ M JS-R containing 10  $\mu$ g/mL solution in the 10 mM HEPES buffer at pH 7.4,  $\lambda_{\text{ex}}$  564 nm.



**Scheme 15.** Fluorescent Glc sensing system based on detection of  $\text{H}_2\text{O}_2$  by using structural change from JS-R to O-pyrone.

## 第5節 小括

CyBA は、近赤外領域に光学特性を示し、Neu5Ac 選択性が比較的高い特徴を有する。また、環状エステルを形成していない JS-R は、 $\text{H}_2\text{O}_2$  に対する反応が素早く、高感度な  $\text{H}_2\text{O}_2$  の検出が可能である。

CyBA は、溶液中及び、5.0% PVA ゲルを模擬的な組織として、ゲル内に注入した際、Neu5Ac と結合することで、蛍光強度が増大し、660 nm バンドパスフィルターを介して、その蛍光を観察することができた。CyBA は、蛍光量子収率の面で課題があり、これを改善する分子設計を行うことで、将来的に *in vivo* 蛍光イメージングへの適用が期待される。その応用としては、CyBA のようにシアル酸と選択的に結合する蛍光性センサー分子であれば、シアル酸を過剰に発現した腫瘍組織へ集積し、蛍光イメージングを利用した腫瘍部位の可視化への適用が期待できる。

JS-R は、GOx 共存下において 1.0 mM の低濃度 Glc で生成された  $\text{H}_2\text{O}_2$  と反応して JS-R が全て O-pyrone に変換されたと考えられる。このことは、 $\text{H}_2\text{O}_2$  検出に基づいた Glc の高感度蛍光測定への適用が期待できる。JS-R を将来的にグルコースセンサーとして利用するためには、臨床における Glc 濃度の測定範囲である、1.0-20 mM の Glc 濃度を測定できることが求められる。これを解決するためには、JS-R 及び GOx 濃度の最適化を行うことが必要である。JS-R のような蛍光性センサー分子は、蛍光測定によるグルコースセンシングツールの一部として有望であり、採血や採尿による体外診断に限らず、皮下組織への留置による *in vivo* での血糖状態のモニタリングへの適用も期待できる。

## 総括

本研究第1章及び第2章で、センシング部位としてホウ素を有する2つの新規蛍光性センサー分子 (CyBA 及び JS-R) を合成し、その化学的特徴、ポリオール結合性及び  $\text{H}_2\text{O}_2$  反応性をそれぞれ調査した結果を述べた。また、第3章では、各種新規蛍光性センサー分子の特徴を考慮した適用に関する検討を行った結果を記述した。

CyBA は、近赤外領域に吸収と蛍光特性を示し、Neu5Ac に対する選択性が高いことが第1章及び第3章から明らかとなった。また、第3章3節の検討で、溶液中及び組織を模倣したゲル内で、Neu5Ac との結合により蛍光が増大することを明らかにした。以上の検討から、CyBA は、細胞糖鎖に含まれる Neu5Ac 認識に基づいた *in vivo* 蛍光イメージングへの適用が期待される。

JS-R は、高い蛍光量子収率 ( $\Phi=0.59$ ) を示し、ポリオール結合性と  $\text{H}_2\text{O}_2$  反応性を示すことが第2章の検討から明らかになった。そのことから、JS-R は直接的なポリオール濃度測定と  $\text{H}_2\text{O}_2$  を利用したバイオセンシングの両者に有用であることが示唆された。前者は、種々ポリオールとの結合により、蛍光強度の減少と蛍光極大の長波長変化を示す特徴を有することから、ポリオール共存下で、二波長の蛍光強度比を用いるレシオ測定を行うことで、ポリオールを感度良く検出可能な試薬としての適用が期待できる。後者については、第2章及び第3章で検討を行い、JS-R は  $\text{H}_2\text{O}_2$  と素早く反応し、O-pyronine への構造変化とそれに伴った蛍光変化を示し、高感度に  $\text{H}_2\text{O}_2$  を検出可能であることがわかった。このことに基づき、第3章4節でグルコースセンシングに関する検討を行った。その結果 JS-R は、GOx による酵素反応で生成される  $\text{H}_2\text{O}_2$  を高感度に検出することを利用した、グルコースセンシングへの適用が期待できる。また更に、JS-R は ROS の一種である  $\text{H}_2\text{O}_2$  と反応し、O-pyronine への構造変化に伴う蛍光変化を示し、高感度に  $\text{H}_2\text{O}_2$  を検出可能であったことから、組織内や細胞内で局所的に発生する  $\text{H}_2\text{O}_2$  を含めた ROS に対する *in vivo* センサーとしての適用も期待

できる。

本研究でホウ素をセンシング部位とする新規蛍光性センサー分子をデザインすることで、近赤外領域に光学特性を示す CyBA と高い蛍光量子収率を示すボリン酸誘導体である JS-R をそれぞれ得ることができた。これらは、ポリオールや ROS の直接的な検出や酵素反応等を利用したバイオセンシングへの適用が期待できる。今後、分子改良及び測定条件の最適化を行うことで、将来的に疾病の診断や動態解析の新たなツールとして応用可能になると期待する。

## 謝辞

本研究に際し、終始御懇篤なる御指導及び御鞭撻を賜りました城西大学大学院薬学研究科薬品物理化学講座教授 關俊暢 先生に深甚なる謝意を表します。

本研究に関して、御指導並びに御助言を賜りました城西大学大学院薬学研究科医薬品化学講座教授 坂本武史 先生に深謝の意を表します。

本研究に関して、御指導並びに御助言を賜りました城西大学大学院薬学研究科 医薬品安全性講座教授 金本郁男 先生に深謝の意を表します。

本研究に際し、終始御指導並びに多大なる御助言を賜りました城西大学大学院薬学研究科薬品物理化学講座准教授 江川祐哉 先生に深謝の意を表します。

本研究に際し、終始有益な御助言を賜りました城西大学大学院薬学研究科薬品物理化学講座助手 三木涼太郎 先生に深謝の意を表します。

本研究の単結晶 X 線構造解析に関して、御協力及び御指導を賜りました埼玉大学大学院理工学研究科物質科学部門物質機能領域 准教授 石丸雄大 先生並びに埼玉大学科学分析支援センター准教授 藤原隆司 先生に深謝の意を表します。

最後に、本研究の遂行にあたり、御協力をいただきました城西大学大学院薬学研究科薬品物理化学講座諸氏並びに、城西大学薬学部薬品物理化学研究室諸氏に感謝致します。

## 実験の部

### 試薬及び材料

Boron trifluoride diethyl etherate liquid( $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ ), 3-(*N,N*-dimethylamino)phenylboronic acid, dimethylsulfoxide- $d_6$  (DMSO- $d_6$ ), formaldehyde 37 wt% solution ACS reagent, glucose oxidase from *Aspergillus Niger*, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), IR-780 iodide, 4-isoquinolineboronic acid, D-sorbitol は、シグマアルドリッチジャパン合同会社 (東京) から購入した。Acetic acid (試薬特級), chloroform (試薬特級), dichloromethane (試薬特級), *N,N*-dimethylformamide (有機合成用, 超脱水), disodium hydrogenphosphate (試薬特級), D-fructose (試薬特級), D-glucose (試薬特級), hydrogen chloride (特級試薬), hydrogen peroxide (試薬特級), magnesium sulfate anhydrous (試薬特級), methanol (HPLC 用), methanol- $d_4$  containing 0.05% TMS (NMR), polyvinyl alcohol 2,000 (試薬), sodium azide (特級試薬), sodium chloride (試薬特級), sodium dihydrogenphosphate (試薬特級), sodium oxide (特級試薬), tetrahydrofuran (有機合成用, 超脱水), triethylamine (特級試薬) は和光純薬工業株式会社 (大阪) から購入した。2-(Bromomethyl)phenylboronic acid は、Combi Blocks (Inc., CA, USA) から購入した。D-Galactose, D-mannose は、東京化成株式会社 (東京) から購入した。5-Acetylneuraminic acid は、長良サイエンス株式会社 (岐阜) から購入した。Sodium sulfate は、関東化学株式会社 (東京) から購入した。L-Fucose は、ナカライテスク (京都) から購入した。Cresyl Violet (for fluorescence standard reference) は、コスモ・バイオ株式会社 (東京) から購入した。CHROMATOREX DIOL 75/100MB-200 (ジオールシリカ) は、富士シリシア化学株式会社 (愛知) から購入した。メンブレンフィルターは、親水性 PTFE, OMNIPORE メンブレンフィルター (25 mm, pore size 0.2  $\mu\text{m}$ ) メルク株式会社 (東京) から購入した。660 nm バンドパスフィルターは、セラテックジャパン株式会社 (長野) から購入した。

## 使用機器

各種質量分析は、JMS-700 (日本電子株式会社, 東京) を使用した。各種 NMR スペクトルは、Varian 400 MR (Varian Inc., CA, USA) で測定した。元素分析は、CHN コーダー MT-6 (株式会社アナテック・ヤナコ, 京都) を使用した。各種吸収スペクトルは、紫外可視分光光度計 JASCO V560, ETC 505T (日本分光株式会社, 東京)、 $1 \times 1 \times 4$  cm の 2 面透明石英セルを使用し、 $25^\circ\text{C}$  条件下で測定した。各種蛍光スペクトル測定は、蛍光光度計 RF-5300PC (島津製作所株式会社, 京都)、 $1 \times 1 \times 4$  cm の 4 面透明石英セルを使用した。フラッシュクロマトグラフィーは、シリカゲルカラム (インジェクトカラム M サイズ, 山善株式会社)、Smart flash AI-580S (山善株式会社, 大阪) を使用した。単結晶 X 線構造解析は、埼玉大学にて APEX II CCD (Burker Inc, MA, USA) を使用した。分子モデリングは、Winmostar<sup>TM</sup> (株式会社クロスアビリティ, 東京) を使用した。量子化学計算は、Gaussian 09 ver. 5.02 (Gaussian Inc., CT, USA) を使用した。キセノン光源は、MAX-303, ミラーモジュール UV-VIS (300-600 nm) (朝日分光株式会社, 東京) を使用した。



## 第1章

### 1. 合成

#### 1-1. 2-(Aminomethyl)phenylboronic acid hydrochloride の合成

Sodium azide 390 mg (6.00 mmol) を蒸留水 14 mL に溶解させた。2-(Bromomethyl)phenylboronic acid 859 mg (4.00 mmol) を tetrahydrofuran 3.0 mL に溶解させ、sodium azide 水溶液に滴下で加えた。混合物を 65°C オイルバス内で 90 分間加熱した。反応開始 90 分後、反応溶液を室温まで冷却し、ethyl acetate (20 mL × 2) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、magnesium sulfate anhydrous (MgSO<sub>4</sub>) で脱水した。MgSO<sub>4</sub> を除去した後、溶媒を減圧留去し、2-(azidomethyl)phenylboronic acid として淡黄色固体を得た。続いて、2-(azidomethyl)phenylboronic acid を methanol 10 mL に溶解させ、triphenylphosphine 1.58 g (6.02 mmol) を加えて 80°C オイルバス内で 90 分間還流した。反応開始 90 分後、反応溶液を室温まで冷却し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣に蒸留水 10 mL、36% HCl aq 1.0 mL、chloroform 10 mL を加え、室温下で 90 分間攪拌した。反応開始 90 分後、反応溶液に蒸留水 30 mL と chloroform 30 mL を加え、水層と有機層を分離した。水層を chloroform (20 mL × 3) で洗浄した後、水相から溶媒を減圧留去した。その残渣を真空乾燥し、2-(aminomethyl)phenylboronic acid hydrochloride として、白色固体を得た (収量 181 mg, 収率 24.2%)。

FAB-MS (positive mode, glycerol matrix), 208 *m/z*, [M-Cl+glycerol-2H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 8.44 (s, 2H), 8.04-8.03 (s, 3H), 7.77-7.74 (d, 1H), 7.44-7.33 (m, 3H), 4.18-4.14 (s, 2H).

#### 1-2. CyBA の合成

IR-780 iodide 335 mg (0.502 mmol) と 2-(aminomethyl)phenylboronic acid hydrochloride 143 mg (0.764 mmol) を *N,N*-dimethylformamide (超脱水) 5.00 mL に溶解させ、

triethylamine 500  $\mu\text{L}$  を加えた。フラスコ内を  $\text{N}_2$  置換した後、遮光室温下で 16 時間攪拌した。反応開始 16 時間後、溶媒を減圧留去し、得られた残渣をジオールシリカ-カラムクロマトグラフィー (chloroform/methanol = 20/1 $\rightarrow$ 5/1) で精製した。溶離した CyBA 溶液から溶媒を減圧留去し、残渣を真空乾燥することにより、濃青色固体として CyBA を得た (収量 94.0 mg, 収率 24.1%)。

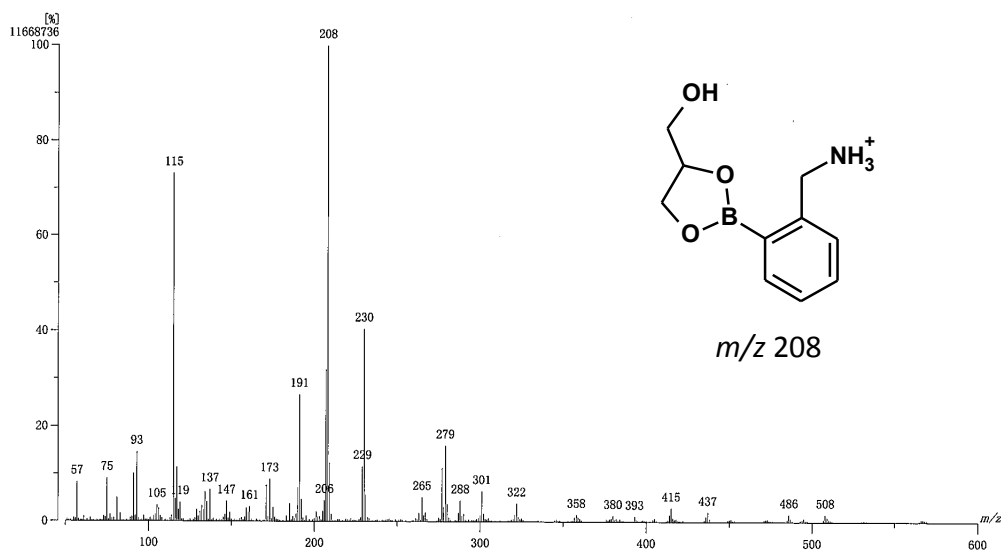
FAB-MS (positive mode, glycerol matrix), 710.5  $m/z$ ,  $[\text{M}-\text{Cl}+\text{glycerol}-2\text{H}_2\text{O}]^+$ .  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, methanol- $d_4$ ):  $\delta$  7.63 (d, 2H), 7.51-7.40 (m, 4H), 7.34-7.29 (m, 4H), 7.10-7.06 (m, 4H), 5.87 (d, 2H), 4.90 (s, 2H), 3.92 (t, 4H), 2.56 (t, 4H), 1.88 (t, 2H), 1.80 (m, 4H), 1.45 (s, 12H), 1.01, (t, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, methanol- $d_4$ ):  $\delta$  168.58, 167.89, 143.02, 141.28, 139.99, 139.74, 132.88, 129.70, 128.27, 127.95, 127.11, 122.75, 121.59, 120.34, 108.92, 94.97, 54.79, 44.09, 27.42, 24.51, 21.61, 19.76, 10.31. Elemental analysis, calculated for  $\text{C}_{43}\text{H}_{55}\text{N}_3\text{O}_3\text{BCl}$  [CyBA $\cdot\text{H}_2\text{O}$ ]: C, 73.01; H, 7.84; N, 5.94. Found: C, 73.21; H, 7.65; N, 5.92%.

## 2. 構造解析

### 2-1. 2-(Aminomethyl)phenylboronic acid 及び CyBA の質量分析

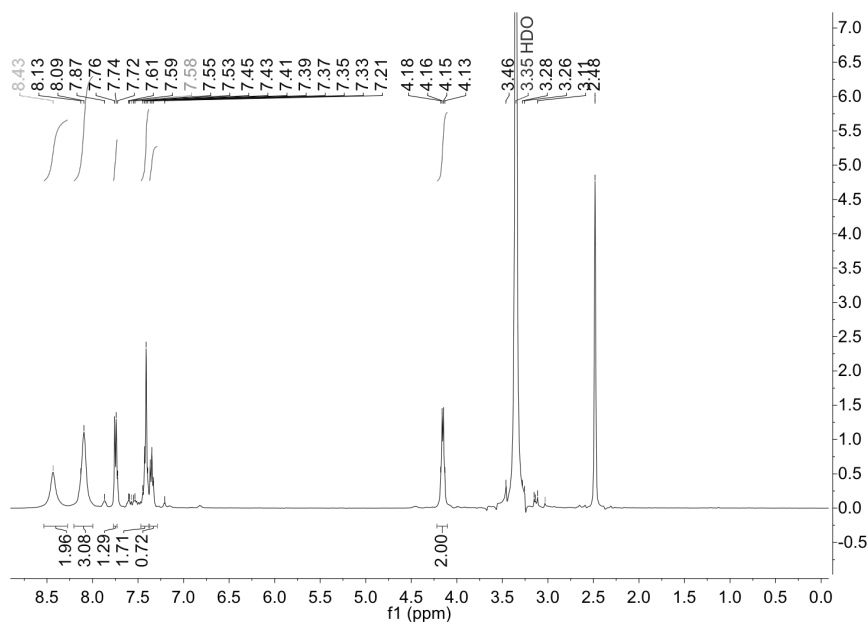
FAB-MS スペクトル (positive mode) は、glycerin をマトリックス、methanol を溶媒として、測定を行った (Figures 6, 43)。

CyBA の FAB-MS を、Figure 6 に示す。



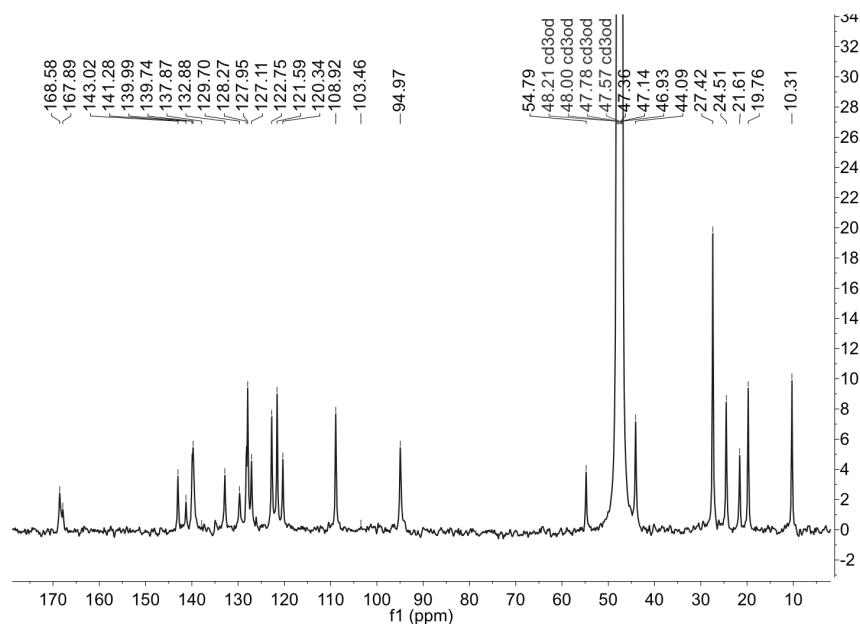
**Figure 43.** FAB-MS (positive mode) and structure of 2-(aminomethyl)phenylboronic acid glycerin complex.

2-2. 2-(Aminomethyl)phenylboronic acid hydrochloride 及び CyBA の NMR 測定  
(Figures 5, 44, 45)



**Figure 44.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 2-(aminomethyl)phenylboronic acid hydrochloride in  $\text{DMSO-}d_6$ .

CyBA の  $^1\text{H}$  NMR スペクトルを、Figure 5 に示す。



**Figure 45.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of CyBA in methanol- $d_4$ .

### 3. CyBA の光学特性調査

#### 3-1. 吸収スペクトル測定

HEPES (10 mM) を含む methanol/water (1/1, v/v) 溶液 (pH 7.4) で  $4.0\ \mu\text{M}$  CyBA 溶液を測定の前日に調製した。この CyBA 溶液の吸収スペクトル測定を行った。CyBA の吸収極大波長 ( $\lambda_{\text{abs}}$ ) は 659 nm、モル吸光係数は  $1.1 \times 10^5\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  であった。

#### 3-2. 蛍光スペクトル測定

HEPES (10 mM) を含む methanol/water (1/1, v/v) 溶液 (pH 7.4) で  $2.0\ \mu\text{M}$  CyBA 溶液を測定の前日に調製した。この CyBA 溶液の蛍光スペクトルは、室温下で測定した。蛍光光度計の測定条件設定は以下の通りである (励起波長 ( $\lambda_{\text{ex}}$ ) 659 nm, 測定波長範囲 450-900 nm, 走査速度 Fast, サンプリング間隔 1.0 nm, バンド幅 励起 10 nm 発光 10 nm, 感度 Low)。CyBA の蛍光極大波長 ( $\lambda_{\text{em}}$ ) は、726 nm であった。

### 3-3. 蛍光量子収率 ( $\Phi$ ) の算出

波長 600 nm における吸光度が 0.02 以下になるような濃度の CyBA (0.20  $\mu$ M) 及び Cresyl Violet (0.20  $\mu$ M) の methanol 溶液を調製し、両溶液の 600 nm の吸光度を測定した (CyBA の吸光度=0.0113, Cresyl Violet の吸光度=0.00756)。次に、同溶液を用いて各々の蛍光スペクトルを測定した。蛍光光度計の測定条件設定は以下の通りである ( $\lambda_{ex}$  659 nm, 測定波長範囲 450-900 nm, 走査速度 Fast, サンプルング間隔 0.2 nm, バンド幅 励起 1.5 nm 発光 5 nm, 感度 High)。各種蛍光スペクトルの半値幅 (蛍光強度値が最大蛍光強度値の半分になる点の横軸の幅) を用いて計算した面積を  $F$  として算出した (CyBA の  $F=54.9$ , Cresyl Violet の  $F=5201$ )。標準試薬 (Cresyl Violet) の蛍光量子収率は、methanol 中で励起波長 600 nm における蛍光量子収率 ( $\Phi_{st}$ ) = 0.54 を用いた<sup>51</sup>。上記で求めた CyBA 及び Cresyl Violet の吸光度、蛍光スペクトルの半値幅面積、Cresyl Violet の  $\Phi_{st} = 0.54$  を以下の式に代入し、CyBA の相対的蛍光量子収率 ( $\Phi_{sm}$ ) を算出した<sup>5,26,52</sup>。

$$\Phi_{sm} = \frac{\Phi_{st} A_{st} F_{sm}}{A_{sm} F_{st}} \quad \dots \text{(式 5)}$$

$\Phi_{sm}$ : 測定試料の蛍光量子収率、 $\Phi_{st}$ : 標準試料の蛍光量子収率、 $A_{sm}$ : 測定試料の 600 nm における吸光度、 $A_{st}$ : 標準試料の 600 nm における吸光度、 $F_{sm}$ : 測定試料の蛍光極大波長の半値幅における蛍光強度面積、 $F_{st}$ : 標準試料の蛍光極大波長の半値幅における蛍光強度面積

Methanol 中における CyBA の  $\Phi_{sm}$  は、 $3.8 \times 10^{-3}$  であった。

### 4. CyBA の各 pH における蛍光スペクトル測定と $pK_a$ の算出

HEPES (10 mM) を含む methanol/water (1/1, v/v) 溶液 (pH 7.4) で 2.0  $\mu$ M CyBA 溶液を測定の前日に調製した。これに 1 M NaOH aq あるいは 1 M HCl aq を添加し、pH 0.5 間隔で各種 pH (pH 4.0-12.0) に調整し、その蛍光スペクトルを測定した。蛍光光度計の測定条件設定は以下の通りである ( $\lambda_{ex}$  659 nm, 測定波長範囲 550-900 nm, 走査速

度 Fast, サンプリング間隔 1.0 nm, バンド幅 励起 10 nm 発光 10 nm, 感度 Low)。各種 pH における CyBA の 700 nm の蛍光強度を pH に対してプロットした。Kaleidagraph を用いてカーブフィッティングを行い、回帰曲線から CyBA のホウ素の  $pK_a$  を求めた<sup>53,54</sup>。

$$F_I = \frac{F_{I0} + F_{Ilim} K_a [H^+]}{1 + K_a [H^+]} \quad \dots \text{(式 6)}$$

$F_I$ : 蛍光強度、 $F_{I0}$ : 蛍光強度初期値、 $F_{Ilim}$ : 蛍光強度最大値、 $K_a$ : 酸解離定数、 $[H^+]$ : プロトン濃度 (M)

CyBA のホウ素の  $pK_a$  値は、9.52 であった。

また、2.0  $\mu$ M CyBA 溶液を用いて 50 mM Fru となる溶液を測定の前日に調製し、同様の方法で CyBA のホウ素の  $pK_a$  を求めた。Fru (50 mM) 共存下の CyBA ホウ素の  $pK_a$  値は、6.38 であった。

## 5. CyBA の各種糖濃度における蛍光スペクトル測定と結合定数 $K$ の算出

HEPES (10 mM) を含む methanol/water (1/1, v/v) 溶液 (pH 7.4) で 2.0  $\mu$ M CyBA 溶液を調製した。この溶液を用いて、各種糖類の糖濃度溶液を測定の前日に調製し、その蛍光スペクトルを測定した。各種糖類の糖濃度は、Table 12 に示した。蛍光光度計の測定条件設定は以下の通りである ( $\lambda_{ex}$  659 nm, 測定波長範囲 550-900 nm, 走査速度 Fast, サンプリング間隔 1.0 nm, バンド幅 励起 10 nm 発光 10 nm, 感度 Low)。各種糖濃度における CyBA の 705 nm の蛍光強度を糖濃度に対してプロットした。CyBA と糖が 1:1 の複合体を形成することを仮定し、Kaleidagraph を用いてカーブフィッティングを行い、回帰曲線から各種糖類に対する結合定数  $K$  を求めた (Table 12)<sup>53,54</sup>。

$$F_I = \frac{F_{I0} + F_{Ilim} K [C]}{1 + K [C]} \quad \dots \text{(式 7)}$$

$F_I$ : 蛍光強度、 $F_{I0}$ : 蛍光強度初期値、 $F_{Ilim}$ : 蛍光強度最大値、 $K$ : 結合定数 ( $M^{-1}$ )、 $[C]$ : ポリオール化合物濃度 (M)

**Table 12.** Concentration (mM) of polyol for fluorescence measurement and calculation of binding constants  $K$  ( $M^{-1}$ ).

	Concentration of polyol (mM)										Binding constants $K$ ( $M^{-1}$ )
	0	1	2	5	10	20	50	100			
Fru	0	1	2	5	10	20	50	100			173.2
Glc	0	10	20	50	100	200	500	1000			4.0
Gal	0	1	2	5	10	20	50	100	200		35.6
Man	0	1	2	5	10	20	50	100	200		11.1
Fuc	0	1	2	5	10	20	50	100	200		12.0
Sor	0	1	2	5	10	20	50	100			317.0
Neu5Ac	0	0.1	0.2	0.5	1	2	5	10	20	30	135.4

## 6. CyBA の $H_2O_2$ 反応性の調査

### 6-1. 環状エステル無形成の CyBA への $H_2O_2$ 添加時の継時的蛍光スペクトル測定

HEPES (10 mM) を含む methanol/water (1/1, v/v) 溶液 (pH 7.4) で 2.0  $\mu$ M CyBA 溶液を測定の前日に調製した。測定当日に、この溶液の蛍光スペクトルを  $H_2O_2$  添加 0 分として測定した。更に、2.0  $\mu$ M CyBA 溶液を用いて、1.0 mM  $H_2O_2$  となる溶液を調製した。この溶液は、メスアップ終了時から時間を計り、5、10、15 分経過時の蛍光スペクトルを測定した。蛍光光度計の測定条件設定は以下の通りである ( $\lambda_{ex}$  659 nm, 測定波長範囲 550-900 nm, 走査速度 Fast, サンプルング間隔 1.0 nm, バンド幅 励起 10 nm 発光 10 nm, 感度 Low)。

### 6-2. Fru と環状エステルを形成した CyBA への $H_2O_2$ 添加時の継時的蛍光スペクトル測定

上記 2.0  $\mu$ M CyBA 溶液を用いて、50 mM Fru となる溶液 (2.0  $\mu$ M CyBA containing 50 mM Fru) を測定の前日に調製した。測定当日に、この溶液の蛍光スペクトルを  $H_2O_2$  添加 0 分として測定した。更に、2.0  $\mu$ M CyBA containing 50 mM Fru を用いて、1.0 mM  $H_2O_2$  となる溶液を調製した。この溶液は、メスアップ終了時から時間を計り、5、10、15、20、25、30、45、60、90 分経過時の蛍光スペクトルを測定した。蛍光光度計の測

定条件は、上記実験と同一条件を設定し、蛍光スペクトル測定を行った。



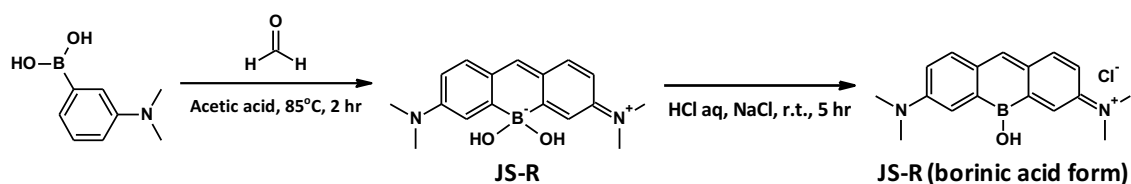
## 第 2 章

### 1. 合成

#### 1-1. JS-R の合成 (Scheme 15)

3-(*N,N*-Dimethylamino)phenylboronic acid 3.00 g (18.2 mmol) を acetic acid 15 mL に溶解させ、formaldehyde 37% solution 6.8 mL (91 mmol) を加えて 85°C オイルバス内で 2 時間攪拌した。反応混合物を室温まで冷却し、飽和炭酸水素ナトリウム水で中和した。混合物を dichloromethane (100 mL × 3) で抽出した。更に、有機層を飽和食塩水で洗浄し、sodium sulfate (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) で脱水した後、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を除去し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムによるフラッシュクロマトグラフィー (移動相 dichloromethane/methanol = 100/0 → 0/100) で粗精製し、crude JS-R として青色固体を得た。続いて、crude JS-R を pH 2 の HCl aq に完全に溶解させた後、1 M NaOH aq を加えて pH 3 に調整した。濾過を行い、浮遊物を除去した後、1 M HCl aq を加えて pH 2 に調整した。その後、飽和濃度付近まで sodium chloride を加え、室温下で 5 時間攪拌した。析出した青色固体を JS-R (borinic acid form) として濾取した (収量 39.0 mg, 含量 63.5%)。

EI-MS: 279 (M<sup>+</sup> without Cl<sup>-</sup>), <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, methanol-*d*<sub>4</sub>): δ 7.76 (s, 1H), 7.58 (d, 2H), 7.24 (s, 2H), 6.83 (d, 2H), 3.34 (s, 12H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, methanol-*d*<sub>4</sub>): δ 161.06, 157.53, 142.73, 130.22, 119.12, 113.74, 40.87. Elemental analysis, calculated for C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>BO<sub>3</sub>Na<sub>2.5</sub>Cl<sub>3.5</sub> [JS-R (borinic acid form) • 5/2NaCl • 2H<sub>2</sub>O]: C 41.09, H 4.87, N 5.64%, found: C 41.26, H 5.00, N 5.44%.



**Scheme 15.** Synthesis of JS-R and JS-R (borinic acid form).

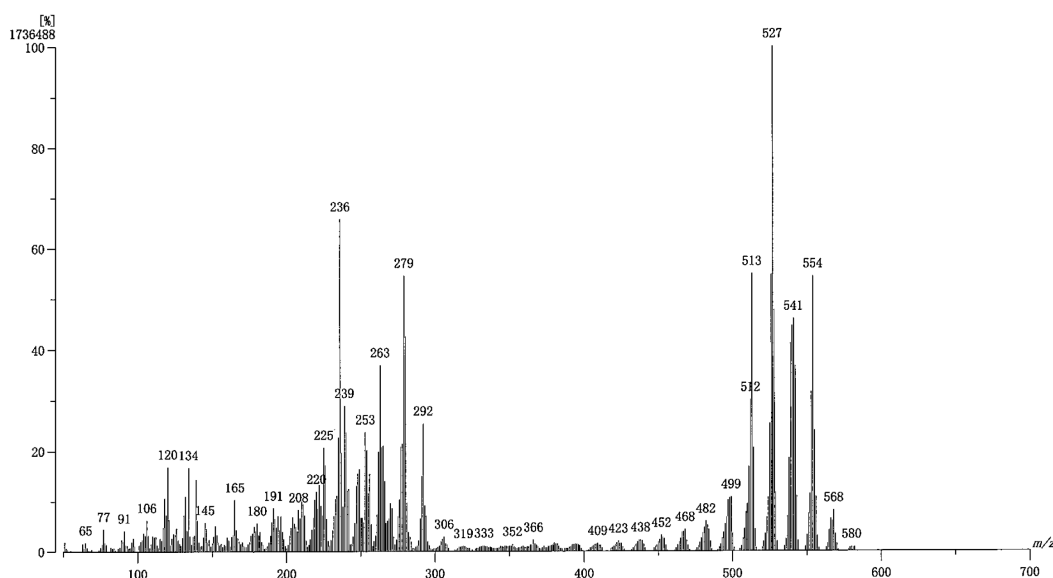
## 1-2. JS-R/CA complex 結晶化

Crude JS-R 48.9 mg を methanol 5 mL に溶解し、CA 92.9 mg を加えた。混合溶液を室温下で 48 時間静置した。析出した JS-R/CA 複合体の結晶を PTFE メンブレンフィルターで濾取し、得られた結晶を真空乾燥した (収量 11.4 mg)。

## 2. 構造解析

### 2-1. MS 測定

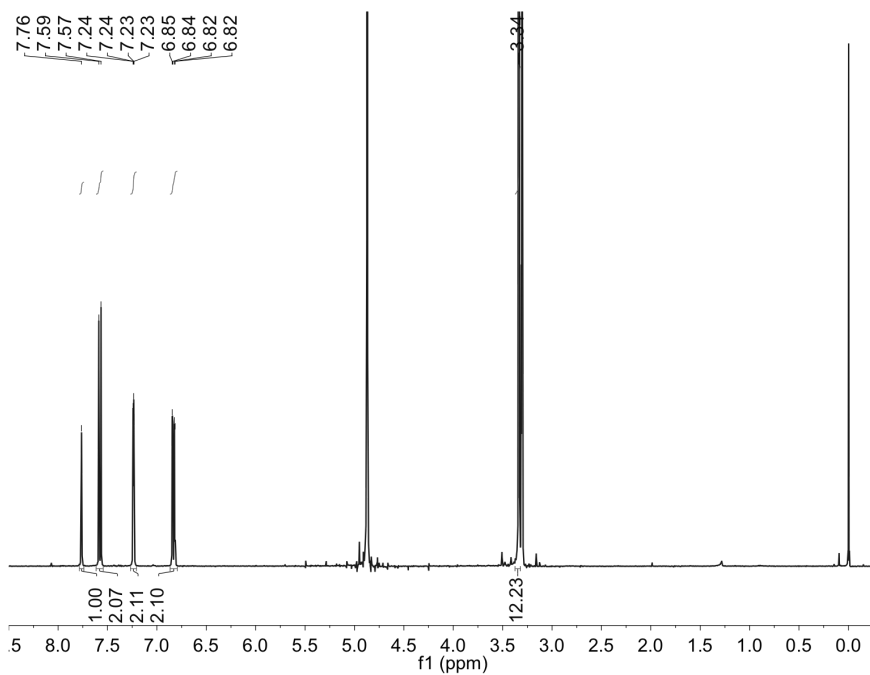
JS-R (borinic acid form) の EI-MS を測定した (Figure 46)。



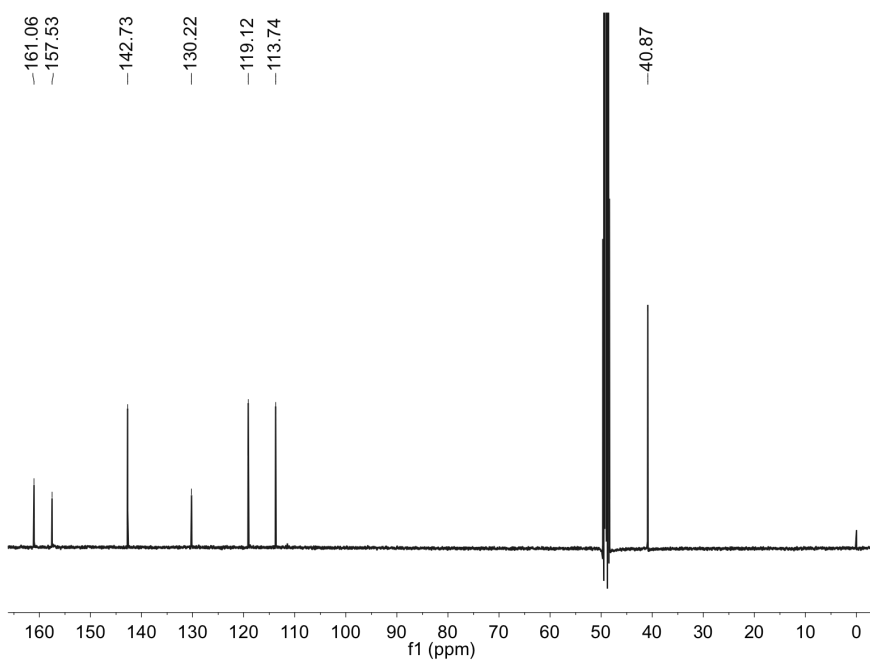
**Figure 46.** EI-MS of JS-R (borinic acid form).

### 2-2. NMR 測定

JS-R (borinic acid form) の  $^1\text{H}$  NMR、 $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルを測定した (Figures 47, 48)。  
 $^{11}\text{B}$  NMR は、boron trifluorodiethyl etherate ( $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ ) を chloroform-*d* 中で測定し、基準ピーク (0 ppm) とした。JS-R の  $^{11}\text{B}$  NMR スペクトルは、JS-R (borinic acid form) を 25 mM phosphate buffer/methanol-*d*<sub>4</sub> (pD 7.4) に溶解させて、JS-R として測定を行った (Figure 22)。



**Figure 47.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of JS-R (borinic acid form) in methanol- $d_4$ .



**Figure 48.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of JS-R (borinic acid form) in methanol- $d_4$ .

## 2-4. 単結晶 X 線構造解析

埼玉大学にて、APEX II CCD (Burker, MA USA) を用いて、構造解析を行った。

## 3. JS-R の光学特性調査

### 3-1. 吸収スペクトル測定

HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) で 6.3  $\mu$ M JS-R 溶液を調製し、吸収スペクトルを測定した。JS-R の  $\lambda_{\text{abs}}$  は 611 nm、モル吸光係数は  $1.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  であった。

### 3-2. 蛍光スペクトル測定

上記実験と同じ溶液の蛍光スペクトルを測定した。蛍光光度計の測定条件設定は以下の通りである ( $\lambda_{\text{ex}}$  611 nm, 測定波長範囲 500-800 nm, 走査速度 Fast, サンプルング間隔 1.0 nm, バンド幅 励起 3 nm 発光 3 nm, 感度 Low)。JS-R の  $\lambda_{\text{em}}$  は、630 nm であった。

### 3-3. 蛍光量子収率 $\Phi$ の算出

波長 600 nm における吸光度が 0.02 以下になるような濃度の JS-R (0.20  $\mu$ M) の methanol 溶液を調製し、600 nm の吸光度を測定した (JS-R の吸光度 = 0.0175)。次に、同溶液を用いて蛍光スペクトルを測定した。蛍光光度計の測定条件設定は以下の通りである ( $\lambda_{\text{ex}}$  600 nm, 測定波長範囲 450-900 nm, 走査速度 Fast, サンプルング間隔 0.2 nm, バンド幅 励起 3 nm 発光 3 nm, 感度 High)。蛍光スペクトルの半値幅 (蛍光強度値が最大蛍光強度値の半分になる点の横軸の幅) を用いて計算した面積を  $F$  として算出した (JS-R の  $F = 10508$ )。上記で求めた JS-R の吸光度、蛍光スペクトルの半値幅面積、第 1 章 3-3. に示した Cresyl Violet の値を (式 5) に代入し、JS-R の  $\Phi_{\text{sm}}$  を算出した<sup>5,26,52</sup>。

Methanol 中における JS-R の  $\Phi_{\text{sm}}$  は、0.59 であった。

#### 4. 各種 pH における JS-R の蛍光スペクトル測定及び、 $pK_a$ の算出

HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) で 6.3  $\mu$ M JS-R 溶液を測定の前日に調製した。これに 1 M NaOH aq あるいは 1 M HCl aq を添加し、pH 0.5 間隔で各種 pH (pH 2.0-13) に調整し、その蛍光スペクトルを測定した。蛍光光度計の測定条件設定は以下の通りである ( $\lambda_{ex}$  611 nm, 測定波長範囲 500-800 nm, 走査速度 Fast, サンプル間隔 1.0 nm, バンド幅 励起 3 nm 発光 3 nm, 感度 Low)。各種 pH における JS-R の 630 nm の蛍光強度を pH に対してプロットした。得られたプロットを基に、第 1 章と同様に Kaleidagraph を用いてカーブフィッティングを行い、回帰曲線から JS-R のホウ素の  $pK_a$  を求めた。

JS-R のホウ素の  $pK_a$  値は、3.99 であった。

また、6.3  $\mu$ M JS-R 溶液を用いて 50 mM Fru となる溶液を測定の前日に調製し、同様の方法で CyBA のホウ素の  $pK_a$  を求めた。50 mM Fru 共存下の JS-R ホウ素の  $pK_a$  値は、3.22 であった。

#### 5. 量子化学計算

分子モデリングソフト Winmostar<sup>TM</sup> を用いて、JS-R 及び JS-R/Fru の分子構造を作成した。作成した各分子構造を初期構造として、量子化学計算プログラム Gaussian 09 ver. 5.02 を用いて、構造最適化を行った。最適化に用いた計算条件は、以下の通りである (DFT, B3LYP/6-311++(d), solvent water)<sup>36</sup>。溶媒効果は、連続誘電体モデル (Polarizable continuum model: PCM) を用いて計算した。最適化された各種構造の HOMO 及び LUMO のエネルギー (a.u.) を eV に換算した (1 Hartree (a.u.) = 27.2114 eV)。各種軌道のエネルギーの計算結果を以下に示す。

JS-R: (HOMO -5.47 eV, LUMO -2.83 eV), JS-R/Fru: (HOMO -5.48 eV, LUMO -2.90 eV)

## 6. 結合定数 $K$ の算出

HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) で 5.0  $\mu$ M JS-R 溶液を調製した。この溶液を用いて、各種糖類の糖濃度溶液を測定の前日に調製し、その蛍光スペクトルを測定した (Table 13)。蛍光光度計の測定条件設定は以下の通りである ( $\lambda_{ex}$  611 nm, 測定波長範囲 550-800 nm, 走査速度 Fast, サンプルング間隔 1.0 nm, バンド幅 励起 3 nm 発光 3 nm, 感度 Low)。各種糖濃度における JS-R の 630 nm の蛍光強度を糖濃度に対してプロットした。得られたプロットを基に、第 1 章と同様に Kaleidagraph を用いてカーブフィッティングを行い、回帰曲線から各種糖類に対する結合定数  $K$  を求めた (Table 13)。

**Table 13.** Concentration (mM) of polyol for fluorescence measurement and calculation of binding constants  $K$  ( $M^{-1}$ ).

	Concentration of polyol (mM)										Binding constants $K$ ( $M^{-1}$ )
	0	1	2	5	10	20	50	100			
Fru	0	1	2	5	10	20	50	100			112.1
Glc	0	5	10	20	50	100	200	500	1000		3.3
Gal	0	5	10	20	50	100	200	500			2.3
Man	0	5	10	20	50	100	200	500	1000		4.2
Fuc	0	2	5	10	20	50	100	200	500		2.4
Sor	0	1	2	5	10	20	50	100			43.3
Neu5Ac	0	0.1	0.2	0.5	1	2	5	10	20		11.2

## 7. JS-R への $H_2O_2$ 添加実験

### 7-1. 吸収スペクトル測定

HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) で 5.0  $\mu$ M JS-R 溶液を測定の前日に調製した。測定当日に、この溶液の吸収スペクトルを 0  $\mu$ M  $H_2O_2$  として測定した。更に、5.0  $\mu$ M JS-R 溶液を用いて、100  $\mu$ M  $H_2O_2$  の溶液を調製した。調製から 15 分経過後に吸収スペクトルを測定した。

### 7-2. 環状エステル無形成の JS-R への $H_2O_2$ 添加時の継時的蛍光スペクトル測定

HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) で 5.0  $\mu\text{M}$  JS-R 溶液を測定の前日に調製した。測定当日に、この溶液の蛍光スペクトルを  $\text{H}_2\text{O}_2$  添加 0 分として測定した。更に、5.0  $\mu\text{M}$  JS-R 溶液を用いて、1.0 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  となる溶液を調製した。この溶液は、メスアップ終了時から時間を計り、5、10、15、20、25、30 分経過時の蛍光スペクトルを測定した。蛍光光度計の測定条件設定は以下の通りである。(  $\lambda_{\text{ex}}$  564 nm, 測定波長範囲 550-800 nm, 走査速度 Fast, サンプリング間隔 1.0 nm, バンド幅 励起 3 nm 発光 3 nm, 感度 Low)

### 7-3. Fru と環状エステルを形成した JS-R への $\text{H}_2\text{O}_2$ 添加時の継時的蛍光スペクトル測定

上記 5.0  $\mu\text{M}$  JS-R 溶液を用いて、50 mM Fru となる溶液 (5.0  $\mu\text{M}$  JS-R containing 50 mM Fru) を測定の前日に調製した。測定当日に、この溶液の蛍光スペクトルを  $\text{H}_2\text{O}_2$  添加 0 分として測定した。更に、5.0  $\mu\text{M}$  JS-R containing 50 mM Fru を用いて、1.0 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  となる溶液を調製した。この溶液は、メスアップ終了時から時間を計り、5、10、15、20、25、30、45 分経過時の蛍光スペクトルを測定した。蛍光光度計の測定条件設定は、第 2 章 7-2 と同一条件を設定し、蛍光スペクトル測定を行った。

### 7-4. 環状エステル無形成の JS-R の各種 $\text{H}_2\text{O}_2$ 濃度における蛍光スペクトル測定

HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) で 5.0  $\mu\text{M}$  JS-R 溶液を測定の前日に調製した。測定当日に、この溶液の蛍光スペクトルを 0  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  として測定した。更に、5.0  $\mu\text{M}$  JS-R 溶液を用いて、各種  $\text{H}_2\text{O}_2$  濃度 (1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200  $\mu\text{M}$ ) の溶液を調製した。調製から 15 分経過後に蛍光スペクトルを測定した。蛍光光度計の測定条件設定は、第 2 章 7-2 と同一条件を設定し、蛍光スペクトル測定を行った。

### 7-5. JS-R と $\text{H}_2\text{O}_2$ との反応生成物のポリオール結合能の調査

HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) で 5  $\mu\text{M}$  JS-R 溶液を測定の前日に調製した。測定当

日に、同溶液を用いて、1.0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の溶液を調製した。調製から 15 分経過後に、蛍光スペクトルを測定した。また、調製から 15 分経過後の同溶液を用いて、50 mM Fru となる溶液を調製し、蛍光スペクトルを測定した。蛍光光度計の測定条件設定は、第 2 章 6-2 と同一条件を設定し、蛍光スペクトル測定を行った。

#### 8. JS-R と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> との反応生成物の構造解析

JS-R (borinic acid) 1.30 mg を methanol 500 μL に溶解させ、30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を 1.00 μL 添加して室温下で 15 分間静置した。その後、溶媒を減圧留去し、残渣を真空乾燥して JS-R と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の反応生成物を固体として得た。得られた反応生成物は、質量分析 (EI-MS) を行った (Figure 33)。更に、高分解能質量分析を行い、その組成式を求めた。

Calc. for C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O; 267.1497 *m/z*, found; 267.1498 *m/z*.



### 第3章

#### 1. 4-Isoquinolineboronic acid (4IQBA) の Fru、Glc 及び、Neu5Ac に対する結合定数 $K$ の算出

HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) で 10  $\mu$ M 4IQBA 溶液を調製した。この溶液を用いて、各種糖類の糖濃度溶液を測定の前日に調製し、その蛍光スペクトルを測定した (Table 14)。蛍光光度計の測定条件設定は以下の通りである。(λ<sub>ex</sub> 331 nm, 測定波長範囲 300-550 nm, 走査速度 Fast, サンプル間隔 1.0 nm, バンド幅 励起 10 nm 発光 10 nm, 感度 Low) 各種糖濃度における 4IQBA の 371 nm の蛍光強度を糖濃度に対してプロットした。得られたプロットを基に、第1章と同様に Kaleidagraph を用いてカーブフィッティングを行い、回帰曲線から各種糖類に対する結合定数  $K$  を求めた (Table 14)。

**Table 14.** Concentration (mM) of polyol for fluorescence measurement and calculation of binding constants  $K$  ( $M^{-1}$ ).

	Concentration of polyol (mM)										Binding constants $K$ ( $M^{-1}$ )
Fru	0	1	2	5	10	20	50	100			1794.1
Glc	0	10	20	50	100	200	500	1000			207.5
Neu5Ac	0	0.1	0.2	0.5	1	2	5	10	20	30	87.0

#### 2. CyBA 及び JS-R の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に対する反応速度定数 $k$ の算出

##### 2-1. 環状エステルを形成した CyBA の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に対する $k$ の算出

[CyBA]  $\ll$  [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] (2.0  $\mu$ M CyBA, 1.0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) であることから、擬1次反応とみなして  $k$  ( $s^{-1}$ ) を算出した。

実験の部第1章 6-2. で得られた、各時間における 700 nm の蛍光強度を自然対数とし、時間に対して片対数プロットして直線化を行った。得られた直線の傾きから  $k$  を求めた。

$$F.I. = F.I._0 e^{-kt} \quad \dots \text{(式 8)}$$

$$\ln F.I. = -kt + \ln F.I._0 \quad \dots \text{(式 9)}$$

$F.I.$ ; 700 nm における蛍光強度、 $F.I._0$ ;  $\text{H}_2\text{O}_2$  添加 0 分の 700 nm における蛍光強度、 $k$ ; 反応速度定数 ( $\text{s}^{-1}$ )、 $t$ ;  $\text{H}_2\text{O}_2$  添加後の経過時間 (s)

## 2-2. 環状エステル無形成及び形成下における JS-R の $\text{H}_2\text{O}_2$ に対する $k$ の算出

$[\text{JS-R}] \ll [\text{H}_2\text{O}_2]$  ( $5.0 \mu\text{M}$  JS-R,  $1.0 \text{mM}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ) であることから、擬 1 次反応とみなして  $k$  ( $\text{s}^{-1}$ ) を算出した。

実験の部第 2 章 7-2. 及び 7-3. で得られた、各時間における 584 nm の蛍光強度を 630 nm の蛍光強度で除して蛍光強度比  $F_R$  ( $F.I._{584 \text{ nm}}/F.I._{630 \text{ nm}}$ ) を求めた。蛍光強度比最大値 ( $F_{Rlim}$ ) から各蛍光強度比 ( $F_R$ ) の差 ( $F_{Rlim} - F_R$ ) を求め、この差を自然対数とし、時間に対して片対数プロットして直線化を行った。得られた直線の傾きから  $k$  を求めた。

$$F_R = F_{Rlim}(1 - e^{-kt}) \quad \dots \text{(式 10)}$$

$$\ln(F_{Rlim} - F_R) = -kt + \ln F_{Rlim} \quad \dots \text{(式 11)}$$

$F_R$ ; 584 nm と 630 nm から求めた蛍光強度比 ( $F.I._{584 \text{ nm}}/F.I._{630 \text{ nm}}$ )、 $F_{Rlim}$ ; 蛍光強度比 ( $F.I._{584 \text{ nm}}/F.I._{630 \text{ nm}}$ ) の最大値、 $k$ ; 反応速度定数 ( $\text{s}^{-1}$ )、 $t$ ;  $\text{H}_2\text{O}_2$  添加後の経過時間 (s)

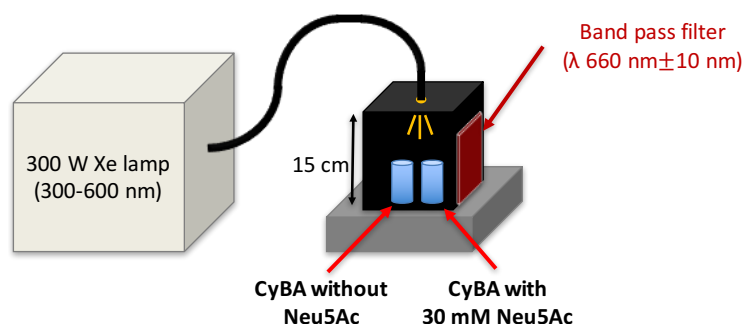
## 3. CyBA の蛍光イメージングへの適用を考慮した実験

### 3-1. サンプル溶液調製

DMSO (50%) を含む PBS 溶液で、 $10 \mu\text{M}$  CyBA 溶液 (CyBA without Neu5Ac) を調製した。同溶液を用いて、 $30 \text{mM}$  Neu5Ac となる溶液 (CyBA with  $30 \text{mM}$  Neu5Ac) を調製した。

### 3-2. 溶液を用いた蛍光イメージングの実験

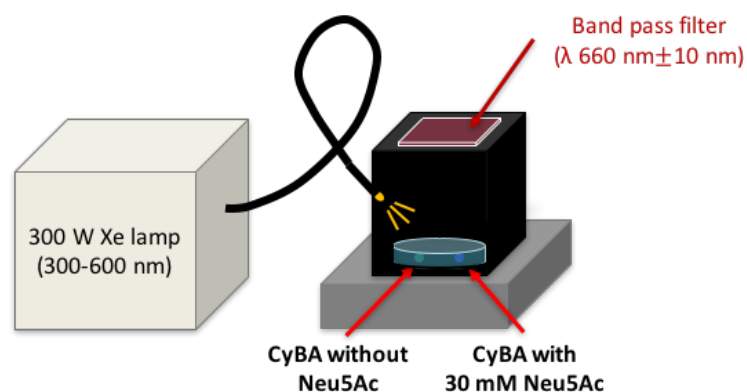
暗室内に、上記実験 (第 3 章 3-1) で調製した CyBA without Neu5Ac 及び CyBA with 30 mM Neu5Ac を設置した。また、660 nm の光を選択的に透過するバンドパスフィルター (660 nm $\pm$ 10 nm) を暗室側面に取り付けた。暗室上部からキセノン光源 (300 W, 300-600 nm) を 15 cm の照射距離で照射した (Scheme 16)。



**Scheme 16.** Evaluation system for fluorescence image of JS-R solution using Xe lamp (300 W, 300-600 nm) and band pass filter (660 nm $\pm$ 10 nm).

### 3-3. PVA (5%) ゲルを模擬的な組織として用いた蛍光イメージングの実験

PVA 溶液 (5%) を調製し、凍結融解法によりゲル化を行った。この 5% PVA ゲル内に実験の部第 3 章 3-1 で調製した CyBA without Neu5Ac 及び、CyBA with 30 mM Neu5Ac をそれぞれ 20  $\mu$ L ずつ注入し、暗室内に設置した。暗室上部にバンドパスフィルター (660 nm $\pm$ 10 nm) を取り付けた。暗室側部からキセノン光源 (300 W, 300-600 nm) を照射距離 約 6 cm、照射角度 約 60°で照射した (Scheme 17)。



**Scheme 17.** Evaluation system for fluorescence image of PVA gel containing JS-R using Xe lamp (300 W, 300-600 nm) and band pass filter (660 nm  $\pm$  10 nm).

#### 4. JS-R の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 検出に基づくグルコースセンシングに関する実験

##### 4-1. Glc 不在下における GOx の有無による JS-R の蛍光スペクトル測定

HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) で 5.0  $\mu$ M JS-R 溶液 (JS-R without GOx and Glc)を調製した。同溶液を用いて 10  $\mu$ g/mL GOx となる溶液 (JS-R with GOx, without Glc) を測定の前日に調製した。両溶液の蛍光スペクトルは、以下の蛍光光度計条件で測定した。  
( $\lambda_{\text{ex}}$  564 nm, 測定波長範囲 550-800 nm, 走査速度 Fast, サンプルング間隔 1.0 nm, バンド幅 励起 3 nm 発光 3 nm, 感度 Low)

##### 4-2. GOx 共存下の JS-R への Glc 添加実験

HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) で 5.0  $\mu$ M JS-R 溶液を調製し、同溶液を用いて 10  $\mu$ g/mL GOx となる溶液 (JS-R with GOx) を測定の前日に調製した。測定当日、JS-R with GOx を用いて、各種 Glc 濃度の溶液 (0, 1, 2, 5, 10, 20 mM) を調製した。溶液調製から 15 分経過時に、各種 Glc 濃度の溶液の蛍光スペクトルを上記の蛍光光度計条件で測定した。

## 参考文献

- 1 A. Masotti, P. Vicennati, F. Boschi, L. Calderan, A. Sbarbati and G. Ortaggi, *Bioconjug. Chem.*, 2008, **19**, 983–987.
- 2 Y. Chu, D. Wang, K. Wang, Z. Luis, B. Weston and B. Wang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2013, **23**, 6307–6309.
- 3 間賀田泰寛, *日薬理誌 (Folia. Pharmacol. Jpn.)*, 2016, **147**, 161–167.
- 4 Y. H. Zhan, W. Liu, R. Sun, X. S. Li and J. F. Ge, *Dye. Pigment.*, 2016, **132**, 223–229.
- 5 T. Myochin, K. Kiyose, K. Hanaoka, H. Kojima, T. Terai and T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, 3401–3409.
- 6 Y. Koide, Y. Urano, K. Hanaoka, T. Terai and T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 5680–5682.
- 7 E. Kittiloespaisan, A. Ojida, I. Hamachi, Y. Seetang-Nun, W. Kiatpathomchai and J. Wongkongkatep, *Chem. Lett.*, 2012, **41**, 1666–1668.
- 8 N. Wu, J. Lan, L. Yan and J. You, *Chem. Commun. (Camb.)*, 2014, **50**, 4438–41.
- 9 J. P. Lorand and J. O. Edwards, *J. Org. Chem.*, 1959, **24**, 769–774.
- 10 X. Pan, X. Yang and C. R. Lowe, *J. Mol. Recognit.*, 2008, **21**, 205–209.
- 11 A. R. Lippert, G. C. Van De Bittner and C. J. Chang, *Acc. Chem. Res.*, 2011, **44**, 793–804.
- 12 X. Sun, S.-Y. Xu, S. E. Flower, J. S. Fossey, X. Qian and T. D. James, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 8311–8313.
- 13 X. Sun, Q. Xu, G. Kim, S. E. Flower, J. P. Lowe, J. Yoon, J. S. Fossey, X. H. Qian, S. Bull and T. D. James, *Chem. Sci.*, 2014, **5**, 3368–3373.
- 14 J. Yoon and A. W. Czarnik, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, 5874–5875.
- 15 T. D. James, K. R. A. S. Sandanayake and S. Shinkai, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1994, **33**, 2207–2209.
- 16 Y. Liu, C. Deng, L. Tang, A. Qin, R. Hu, J. Z. Sun and B. Z. Tang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 660–663.
- 17 R. Hosseinzadeh, M. Mohadjerani, M. Pooryousef, A. Eslami and S. Emami, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2015, **144**, 53–60.
- 18 S. Jin, J. Wang, M. Li and B. Wang, *Chem. Eur. J.*, 2008, **14**, 2795–2804.
- 19 T. D. James, *Chem. Commun.*, 2016, **52**, 3456–3469.
- 20 N. Topaloglu, M. Gulsoy and S. Yuksel, *Photomed. Laser Surg.*, 2013, **31**, 155–162.
- 21 K. Kiyose, H. Kojima, Y. Urano and T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **98**, 6548–6549.
- 22 N. S. James, Y. Chen, P. Joshi, T. Y. Ohulchanskyy, M. Ethirajan, M. Henary, L.

- Strekowski and R. K. Pandey, *Theranostics*, 2013, **3**, 692–702.
- 23 R. Lunt III and Y. Zhao, *20140283896A1*, 2014-09-25.
- 24 F. Ito, R. Ohta, Y. Yokota, K. Ueno, H. Misawa and T. Nagamura, *Opt. Photonics J.*, 2013, **3**, 27–31.
- 25 M. Beija and C. A. M. Afonso, *Chem. Soc. Rev.*, 2009, **38**, 2410–2433.
- 26 Y. Koide, Y. Urano, K. Hanaoka, T. Terai and T. Nagano, *ACS Chem. Biol.*, 2011, **6**, 600–608.
- 27 J. Liu, Y.-Q. Sun, H. Zhang, H. Shi, Y. Shi and W. Guo, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2016, **8**, 22953–22962.
- 28 H. Nie, J. Jing, Y. Tian, W. Yang, R. Zhang and X. Zhang, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2016, **8**, 8991–8997.
- 29 X. Chai, X. Cui, B. Wang, F. Yang, Y. Cai, Q. Wu and T. Wang, *Chem. Eur. J.*, 2015, **21**, 16754–16758.
- 30 J. Arden-Jacob, J. Frantzeskos, N. U. Kemnitzer, A. Zilles and K. H. Drexhage, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2001, **57**, 2271–2283.
- 31 T. Myochin, K. Hanaoka, S. Iwaki, T. Ueno, T. Komatsu, T. Terai, T. Nagano and Y. Urano, *J. Am. Chem. Soc.*, 2015, **137**, 4759–4765.
- 32 A. N. Butkevich, G. Y. Mitronova, S. C. Sidenstein, J. L. Klocke, D. Kamin, D. N. H. Meineke, E. D’Este, P. T. Kraemer, J. G. Danzl, V. N. Belov and S. W. Hell, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2016, **55**, 3290–3294.
- 33 W. Ni, G. Kaur, G. Springsteen, B. Wang and S. Franzen, *Bioorg. Chem.*, 2004, **32**, 571–581.
- 34 N. Shimomura, Y. Egawa, R. Miki, T. Fujihara, Y. Ishimaru and T. Seki, *Org. Biomol. Chem.*, 2016, **14**, 10031–10036.
- 35 G. Wesela-Bauman, M. Urban, S. Lulinski, J. Serwatowski and K. Wozniak, *Org. Biomol. Chem.*, 2015, **13**, 3268–3279.
- 36 M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Had and W. CT, *Gaussian 09, Revision A. 02*, 2009.
- 37 W. Duan, X. Shen, J. Lei, Q. Xu, Y. Yu, R. Li, E. Wu and Q. Ma, *Biomed Res. Int.*, 2014, **2014**, 258402.
- 38 D. A. Butterfield, F. Di Domenico and E. Barone, *Biochim. Biophys. Acta*, 2014, **1842**, 1693–1706.
- 39 K. Shikata, T. Ninomiya and Y. Kiyohara, *Cancer Sci.*, 2013, **104**, 9–14.
- 40 T. Zhang and E. V Anslyn, *Org. Lett.*, 2007, **9**, 1627–1629.
- 41 藤田保健衛生大学「臨床検査学入門」編集委員会, 医療領域における臨床検査学入門, 第3版, KTC中央出版, 2013.

- 42 F. He, F. Feng, S. Wang, Y. Li and D. Zhu, *J. Mater. Chem.*, 2007, **17**, 3702–3707.
- 43 K. Wannajuk, M. Jamkatoke, T. Tuntulani and B. Tomapatanaget, *Tetrahedron*, 2012, **68**, 8899–8904.
- 44 A. Varki, R. D. Cummings, Jeffrey D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart and M. E. Etzler, コールドスプリングハーバー 糖鎖生物学, 第 2 版, 鈴木康夫 (監訳), 丸善, 東京, 2010.
- 45 M. L. S. Silva, *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer*, 2015, **1856**, 165–177.
- 46 B. Byrne, G. G. Donohoe and R. O. Kennedy, *Drug Discov. Today*, 2007, **12**, 319–326.
- 47 Y. Cheng, N. Ni, W. Yang and B. Wang, *Chem. A Eur. J.*, 2013, **16**, 15328–15338.
- 48 T. Ando, H. Ando and M. Kiso, *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, 2001, **13**, 573–586.
- 49 X.-D. Xu, H. Cheng, W.-H. Chen, S.-X. Cheng, R.-X. Zhuo and X.-Z. Zhang, *Sci. Rep.*, 2013, **3**, 2679.
- 50 T. Yamashita, A. Matsumoto, Y. Miyahara and N. Nishiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 15501–15507.
- 51 S. J. Isak and E. M. Eyring, *J. Phys. Chem.*, 1992, **96**, 1738–1742.
- 52 Q. A. Best, A. E. Johnson, B. Prasai, A. Rouillere and R. L. Mccarley, *ACS Chem. Biol.*, 2016, **11**, 231–240.
- 53 C. R. Cooper and T. D. James, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2000, **1**, 963–969.
- 54 B. Valeur, J. Pouget, J. Bourson, M. Kaschke and N. P. Ernsting, *J. Phys. Chem.*, 1992, **96**, 6545–6549.