

氏名 おおいし ゆうき 大石 雄基

学位の種類 博士 (薬科学)

学位記番号 富医薬博甲第 198 号

学位授与年月日 平成 28 年 3 月 23 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士後期課程
薬科学専攻

学位論文題目 ピリジン-アセチレン-フェノール骨格からなるオリゴマーの
分子認識能とその応用に関する研究
(Study on molecular recognition ability and application of
oligomers consisted of pyridine-acetylene-phenol units)

論文審査委員

(主査)	教授	矢倉 隆之
(副査)	教授	松矢 裕二
(副査)	教授	井上 将彦 (指導教員)

ピリジン-アセチレン-フェノール骨格からなるオリゴマーの 分子認識能とその応用に関する研究

大学院医学薬学教育部 薬科学専攻 薬化学研究室
大石 雄基

人工分子による糖認識は、ホストゲスト化学分野において注目を集めているトピックであり、これまでに数多くの人工ホスト分子が開発されてきている。高い会合力を有する糖認識ホストは、糖の誘導化反応の有機合成や糖を輸送する人工チャネルの模索などへの生化学に応用できる。また生体内においても、糖認識はがん化や細胞接着の鍵になるなど、その分子論的追求は生体模倣化学を推進する。

申請者が所属する研究グループでは、人工糖認識ホスト分子であるエチニルピリジンポリマー、オリゴマーに関する研究を行なっている。ピリジン環の窒素原子と糖分子のヒドロキシ基とが水素結合することで、それらのホスト分子はらせん構造を形成しながら糖分子と会合できる(図1)。申請者はより強く糖と会合できるホスト分子の開発を目指して、ピリジン-アセチレン-フェノール骨格を有する分子に関する研究を行なった。ピリジン-アセチレン-フェノール骨格では、ピリジン環が水素結合アクセプターとして、フェノール環が水素結合ドナーとして働くことで、糖分子のヒドロキシ基と push-pull 型の水素結合が形成される(図2)。このため、この骨格が複数ユニット連なったオリゴマーは糖分子との強い会合が期待される。

1. ピリジン-アセチレン-フェノール分子の水素結合能と光学的特性¹⁾

ピリジン-アセチレン-フェノール骨格を持つ分子が、ゲスト分子のヒドロキシ基と push-pull 型の水素結合を形成できることを調べるために、モデル分子 **1** を合成した(図3)。モデル分子 **1** の重クロロホルム溶液 (7.5×10^{-4} M) に MeOH (1.6×10^{-1} M) を添加し $^1\text{H NMR}$ 測定を行なったところ、**1** のピリジン環のプロトンのシグナルが高磁場側へとシフトした(図4)。これは MeOH との会合により、**1** のシソイド配座が優位になり、ピリジン環のプロトンがフェノールの酸素原子からの電場効果を受けにくくなったためだと考えられる。滴定実験より **1** と MeOH の会合定数は $1.2 \times 10^1 \text{ M}^{-1}$ と算出され、**1** は MeOH と強く会合できることが明らかとなった。

また、光学的特性について調査する過程で、モデル分子 **1** とその MOM 保護体 **2** が高効率で発光することが明らかになった。*n*-ヘキサン中の α -ナフチルアミンの蛍光量子収率 ($\phi_f = 0.48$) を基準にして、1,2-ジクロロエタン (DCE) 溶液中での **1** と **2** の ϕ_f を測定したところ、それぞれ 0.44、0.98 と求まった。

モデル分子 **1** は酸として働くフェノール部位、塩基として働くピリジン部位を持っているので、それらの酸・塩基性についても調査した。トリフルオロ酢酸あるいは *n*-Bu₄NOH を加える滴定実験を行なったところ、いずれの場合でも **1** の UV-vis、蛍光スペクトルの大きな変化が観測された (図 5)。

2. 疎水性ピリジン-アセチレン-フェノールオリゴマーによる有機溶媒中での糖認識と天然糖の認識²⁾

糖との強い会合を期待し、アセチレン結合を介してピリジン-アセチレン-フェノール骨格が 3 または 6 ユニット連なった疎水性オリゴマー **3**、**4** を合成した (図 6)。オリゴマー **4** の DCE 溶液に有機溶媒に可溶性 octyl β -D-glucoside (**oct- β -Glc**, 0 ~ 4.5 $\times 10^{-6}$ M) を添加したところ、380 nm 付近に負の円二色性 (CD) が誘起された (図 7)。滴定実験により、**4** と **oct- β -Glc** との会合定数は約 10⁷ M⁻¹ と非常に大きいことがわかった。

この糖誘導体と強く会合できるオリゴマー **4** を用いて、天然の糖の固液抽出を試みた。 β -D-グルコースの結晶 (10 mg) を **4** の DCE 溶液 (4.2 $\times 10^{-6}$ M, 5 mL) に添加し、10 時間室温で攪拌した。その後、不溶物をメンブランフィルター (PTFE, ϕ 0.20 μ m) で除いた後、ろ液の CD スペクトルを測定したところ、図 7 の実験の場合とほぼ同様な負の CD バンドが観測された (図 8)。これは、 β -D-グルコースが固相から DCE 中へと抽出できたことを示している。他の様々な天然の単糖、二糖、三糖またはヌクレオシドについても固液抽出を試みた結果、**4** は様々な基質を固液抽出できることが明らかとなった。また、固液抽出の競合実験を行なったところ、オリゴマー **4** は D-マンノースを選択的に抽出できることが分かった。

固液抽出よりもさらに難しい液液抽出についても、オリゴマー **4** を用いて試みた。**4** の DCE 溶液 (4.2 $\times 10^{-6}$ M, 5.0 mL) に D-マンノースの水溶液 (2.0 M, 5.0 mL) を混ぜあわせた後、10 時間振盪した。その後 DCE 層のみを取り出し、Na₂SO₄ で乾燥させた後に CD スペクトルを測定した (図 9)。強度は弱いものの、固液抽出の場合と同様の誘起 CD が観測された。液液抽出実験を D-グルコース、D-フルクトース、D-マルトース をそれぞれ用いて行なったが、それらの糖のときには CD は誘起されなかった。4 種の糖の中では D-マンノースが高選択的に液液抽出されることがわかった。

オリゴマー **4** の水溶液中からの糖の抽出を定量的に評価するために、糖の液膜輸送を試みた。U 字管の下層に **4** の重クロロホルム溶液 (5.0 $\times 10^{-3}$ M, 10 mL)、2 箇所ある上層の片側に D-マンノースの重水溶液 (2.0 M, 2 mL)、もう片側に

重水のみ (2 mL) を置き、重クロロホルム層を室温で 84 時間攪拌した (図 10)。その後、輸送先の重水層に内標として Sodium 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonate (DSS、 1.0×10^{-3} M) を添加し、 ^1H NMR 測定を行った。その結果、D-マンノースの輸送が確認され、その輸送先の重水中の濃度は 3.3 mM と見積もられた (図 11a)。D-グルコース、D-フルクトースでも同様の輸送実験を行ったが、輸送された糖の量は D-マンノースのときの 3 分の 1 程度であった (図 11b, c)。D-マンノースの輸送速度は、他の糖に比べて明らかに速かった。

3. 両親媒性ピリジン-アセチレン-フェノールオリゴマーによる水中での糖、アミノ酸、ヌクレオシドの認識³⁾

水中での糖認識能評価を行うために、オリゴエチレングリコール鎖が導入された両親媒性ピリジン-アセチレン-フェノールオリゴマー **5** を合成した (図 12)。この両親媒性オリゴマー **5** の水溶液 (1.0×10^{-4} M) に、D-グルコース、D-マンノースのような単糖 (1.0 M)、マルトースやスクロースのような二糖 (5.0×10^{-1} M) を添加した際、誘起 CD は観測されなかった。水中では水素結合が阻害されるために、オリゴマー **5** はヒドロキシ基しかもたない糖とは会合できなかったものと思われる。しかし、2 位にアミノ基を有する D-グルコサミン塩酸塩 (1.0×10^{-3} M) を添加したところ、377 nm に負の誘起 CD が現われた (図 13)。グルコサミンの pK_a は 12.3 であるので、中性条件下においてはアミノ基がプロトン化されており、共役酸のアンモニウムカチオンの正電荷がオリゴマー **5** との会合を強めたと考えられる。また、L-セリン (4.0×10^{-2} M) や L-ヒスチジン (2.0×10^{-1} M) などのアミノ酸、ヌクレオシドであるウリジン (1.0×10^{-1} M) を **5** の水溶液 (1.0×10^{-4} M) に添加した際にも、誘起 CD が観測された (図 14)。

以上をまとめると、ピリジン-アセチレン-フェノールオリゴマーは天然の糖の抽出や輸送を行うことができ、さらに水中でも糖と会合ができるなど、糖認識ホスト分子の骨格として有用なものだと言える。これらのホスト分子は、糖を通過させる人工チャネル等、薬学的な応用に用いることができる可能性を秘めている。

参考文献

- 1) Ohishi, Y.; Abe, H.; Inouye, M. *Heterocycles.*, **2015**, *90*, 515–528.
- 2) Ohishi, Y.; Abe, H.; Inouye, M. *Chem. Eur. J.*, **2015**, *21*, 16504–16511.
- 3) Ohishi, Y.; Abe, H.; Inouye, M. in preparation.

図 4, 5 は参考文献 1)、図 7, 8 は参考文献 2)、図 13, 14 は参考文献 3) を参照せよ。

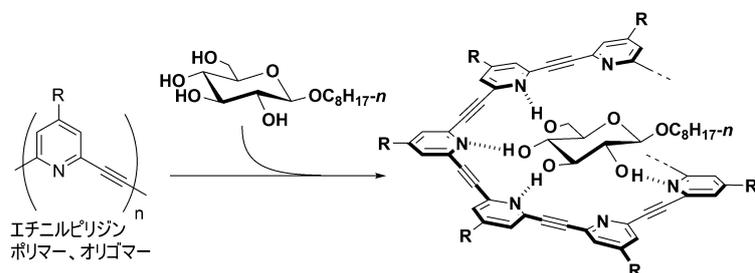


図 1. エチニルピリジンポリマー、オリゴマーの糖認識の
模式図.

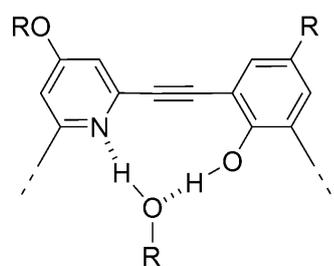


図 2. ピリジン-アセチレン-フェノール
骨格の push-pull 型の水素結合

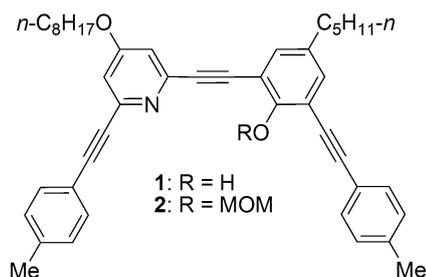


図 3. モデル分子 1 とその
MOM 体 2 の構造.

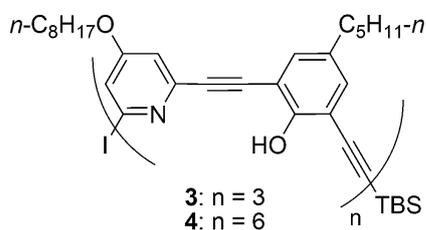


図 6. 疎水性ピリジン-アセチレン-
フェノールオリゴマー 3, 4 の
構造.

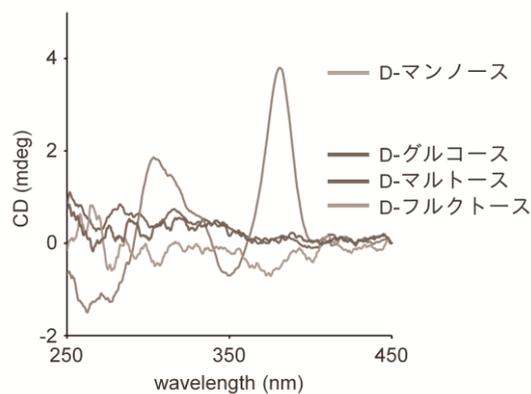


図 9. 4 を用いて天然の糖 (2 M) の液液抽出を試みた後の DCE 溶液の CD スペクトル. 条件: [4] = 4.2×10^{-6} M, DCE, 25 °C, 光路長 10 mm.

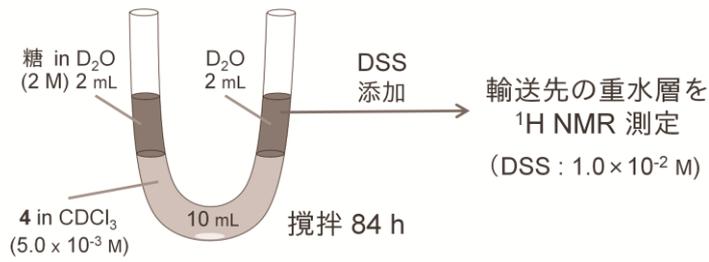


図 10. 輸送実験の概略図.

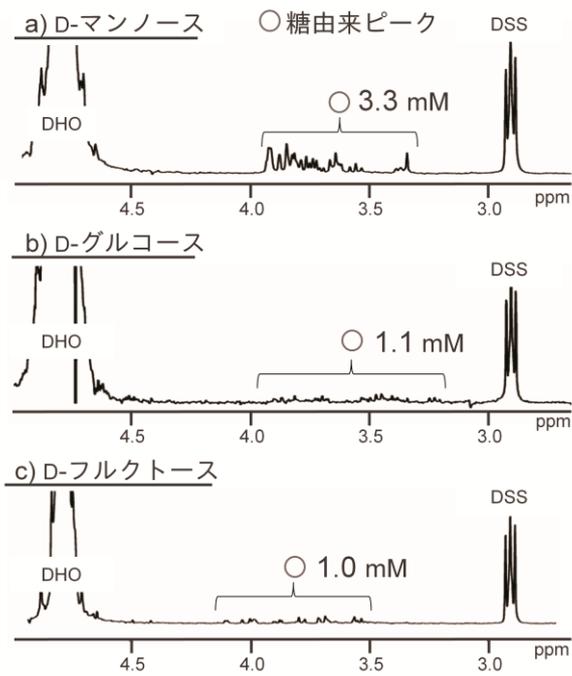


図 11. **4** を用いて液膜輸送を試みた後の輸送先の重水溶液の ^1H NMR スペクトル. a) D-マンノース, b) D-グルコース, c) D-フルクトース. 測定条件: 400 MHz, D_2O , 23 $^\circ\text{C}$.

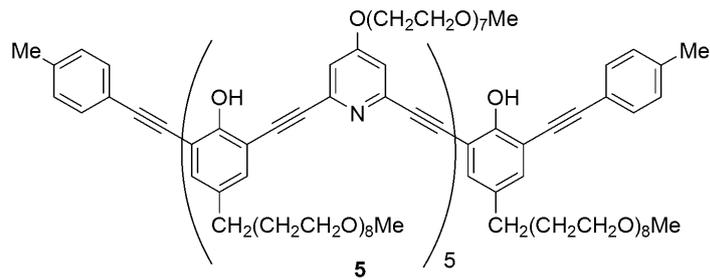


図 12. 両親媒性ピリジン-アゼチレン-フェノールオリゴマー **5** の構造.

学位論文審査の要旨

ホスト・ゲスト化学の分野において糖認識に関する研究は注目を集めており、これまでに数多くの人工ホスト分子が開発されてきた。学位申請者は、糖と極めて強く会合する新規ホスト骨格の開発を目指し、ピリジン-アセチレン-フェノール構造に着目した。この骨格においては、ピリジン環が水素結合アクセプターとして、フェノール環が水素結合ドナーとして働くことで、糖分子のヒドロキシ基と push-pull 型の水素結合を形成すると期待した。そこで学位申請者は、この構造が多数連なったオリゴマーの糖分子に対する分子認識能を精査するため、以下の 3 項目に関して研究を行なった。

ピリジン-アセチレン-フェノール分子の水素結合能と光学的特性

最初に、ピリジン-アセチレン-フェノール構造を 1 ユニットだけ有するモデル分子を合成し、その基本的な物性の評価を行なった。水素結合能を調査するためにモデル分子の重クロロホルム溶液にメタノールを添加し、 $^1\text{H NMR}$ の変化を追跡した。モデル分子の芳香族領域のシグナルのケミカルシフトはメタノールの添加に伴って変化し、それらの会合定数は約 10^1 M^{-1} と求まった。1,2-ジクロロエタン溶液中におけるモデル分子の光学的特性を調べたところ、モデル分子とそのメトキシメチル保護体が高い蛍光量子収率を有することが明らかとなった。モデル分子の酸・塩基応答性を調査するために、モデル分子にトリフルオロ酢酸や水酸化テトラブチルアンモニウムを添加したところ、紫外可視と蛍光スペクトルの変化が観測された。モデル分子の塩基への応答性は鋭敏であり、モレキュラーシーブスから溶け出す微量の塩基性物質によっても、モデル分子の紫外可視スペクトルは変化した。

疎水性ピリジン-アセチレン-フェノールオリゴマーによる有機溶媒中での糖認識と天然糖の認識

ピリジン-アセチレン-フェノール構造がアセチレン結合を介して 6 ユニット連なったオリゴマーを合成し、その糖認識能を調査した。オリゴマーの 1,2-ジクロロエタン溶液に対してオクチル $\beta\text{-D}$ -グルコピラノシドを添加したところ、円二色性 (CD) の誘起が観測され、キラルならせん型会合体の形成が確認された。このオリゴマーとオクチル $\beta\text{-D}$ -グルコピラノシドとの会合定数は、約 10^7 M^{-1} と非常に高いことが分かった。糖との強い会合能を示したこのオリゴマーは、天然の単糖や二糖、さらにはヌクレオシドを非極性溶媒中へと固液抽出できた。固液抽出におけるゲストの選択性を調べる目的で競合実験を行なっ

たところ、オリゴマーは D-マンノースを選択的に抽出することが明らかとなった。固液抽出よりもさらに難しい液液抽出実験においても、オリゴマーは D-マンノースを水中から抽出することが分かった。液膜輸送実験により、糖の水溶液からの抽出速度の評価を行なった結果、D-グルコースや D-フルクトースより、D-マンノースの輸送が速いことが分かった。

両親媒性ピリジン-アセチレン-フェノールオリゴマーによる水中での糖、アミノ酸、ヌクレオシドの認識

オリゴエチレングリコール鎖が導入された両親媒性ピリジン-アセチレン-フェノールオリゴマーを合成し、水中での生体分子の認識能を評価した。両親媒性オリゴマーの水溶液に、D-グルコースや D-マンノースのようなヒドロキシ基しかもたない糖を添加しても、CD は誘起されなかった。一方で、2 位にアミノ基を有する D-グルコサミン塩酸塩を添加したところ誘起 CD が観測され、滴定実験から会合定数は約 10^3 M^{-1} と求められた。van't Hoff プロットより、両親媒性オリゴマーと D-グルコサミンとの会合は、レクチンなどの糖認識タンパクと同様にエンタルピーの利得を駆動力にしていることが分かった。また、L-セリンや L-ヒスチジンなどのアミノ酸、ヌクレオシドであるウリジンの場合にも誘起 CD が観測され、このオリゴマーは糖以外の生体分子とも水中で会合できることが明らかとなった。

以上、学位申請者が新規に開発したピリジン-アセチレン-フェノールオリゴマーは、天然の糖の抽出や輸送を行うことができ、さらに水中でも糖類と会合した。これらの結果より、この構造は糖認識ホスト分子として極めて有用であると判明した。今後、糖の変換反応の触媒、また糖を通過させる人工チャネル等、有機合成化学や生化学への応用も期待される。

主査および副査は、申請者大石雄基君に面接試験を行うとともに論文内容を綿密に審査し、この論文が博士（薬科学）を受けるに十分に値すると判断した。

- 1) Ohishi, Y.; Abe, H.; Inouye, M. A new class of structurally simple and highly emissive fluorophores with a pyridine-acetylene-phenol conjugate, *Heterocycles* **2015**, *90*, 515-528.
- 2) Ohishi, Y.; Abe, H.; Inouye, M. Native mannose-dominant extraction by pyridine-phenol alternating oligomers having an extremely efficient repeating

motif of hydrogen-bonding acceptors and donors, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 16504–16511.