

審査の結果の要旨

氏名 水 上 進

生体内には様々な種類のアニオン種が存在し、生命現象において重要な役割を担っている。また、リン酸化反応を初めとしてアニオン性残基が関与する生体反応も多い。アニオン種およびアニオン関連反応の生理的役割を解明する場合、それらを特異的に検出する蛍光プローブを用いることができれば有用である。近年、多くの研究者が蛍光アニオンセンサーの開発研究を行っている。しかし、現段階では高濃度のハロゲン化物イオンを検出する化合物を除いて、実用化されているものは存在しない。その理由の一つとして、既存の蛍光アニオンセンサーのほとんどが水溶液中では機能しないことが挙げられる。水上は培養細胞および生体組織への応用を視野に入れて、中性緩衝液においても機能する蛍光アニオンセンサーの開発を目指して研究を行った。

水溶液中で機能する蛍光アニオンセンサーに要求される特性として、

①水溶液中で特定のアニオン種と十分な結合能を有すること

②アニオン認識を蛍光シグナル（蛍光強度・波長・蛍光寿命などの変化）に変換できる事の2つが挙げられる。アニオン種は一般的に金属イオンなどのカチオン種よりもサイズが大きく、また水和の影響を受けやすい為、水溶液中でアニオンを捕捉することは比較的困難である。本研究では水溶液中で機能するアニオンセンサー分子を開発する為に（Ⅰ）大環状ポリアミンおよび（Ⅱ）金属錯体の二種類のアニオンホストを用い、アニオンセンサーの開発研究を行った。

（Ⅰ）大環状ポリアミンをアニオンホストとするセンサー分子の開発研究

蛍光センサーの開発に先立ち、より合成の容易な非蛍光性化合物を用いて検出原理のデザインを行った。まず、*p*-nitroaniline 誘導体を合成した。*p*-nitroaniline のアミノ基は極めて塩基性が低く、アルカリ性から弱酸性までの水溶液中では全くプロトン化していない。しかし、大環状ポリアミン骨格の中に組み込むことで他のアミノ基に結合しているプロトンと水素結合し、スペクトルが短波長側にシフトした。アニオンホスト（ポリアミン）部位と相互作用するアニオン種が存在する場合、アニオン種がプロトン化した大環状ポリアミンに結合することで *p*-nitroaniline のアミノ基とプロトンとの間の水素結合が弱まり、スペクトル変化を起こすことが期待できる。

合成した化合物を含む水溶液に様々なアニオン種を添加し、その吸収スペクトル変化を測定した結果、二種類の化合物において、中性緩衝液にピロリン酸イオンを添加していくと吸収スペクトルのシフトが観察された。また、同様のスペクトル変化は、より高濃度のリン酸イオンの添加によっても観察された。得られた結果から、これらの化合物が中性の水溶液中で吸収スペクトル変化を起こすアニオンセンサーとして機能することが明らかとなった。これらの化合物を蛍光化合物へ誘導体化することにより、水溶液中で機能する蛍光アニオンセ

ンサーの開発に繋がると考えられる。

(II) 大環状ポリアミン-金属錯体をアニオンホストとして有する蛍光センサー分子の開発

次に、金属錯体をアニオンホストとして有するアニオンセンサーをデザインした。cyclen Zn^{II} 錯体は中性の水溶液中でリン酸イオンと強い相互作用をすることから、金属の配位子として大環状ポリアミンを選んだ。蛍光色素としては、7位の置換基の性質によって蛍光特性が変化する7位置換クマリンを用いた。この7-アミノ基を中心金属に配位させて、アニオン種が金属錯体と相互作用すれば7-アミノ基のみが外れ、蛍光特性が変化すると考えられる。合成した数種類の化合物に金属を添加して検討したところ、各種スペクトルおよび pH 滴定の結果から、 Cd^{II} 錯体化合物が水中で7-アミノ基が Cd^{II} イオンに配位することが明らかとなった。これはアニオンセンサーとして機能する為の必要条件であることから、この化合物のアニオンセンサーとしての能力を詳細に検討した。

Cd^{II} 錯体化合物について検討した結果、アニオン添加によって錯体の構造が変化したことが示された。各種アニオンを添加したときの励起スペクトルのピーク波長の蛍光強度変化をもとに見かけの解離定数を算出するなど、種々検討した結果、アニオン種の価数が大きいほど、またハロゲンイオンにおいてはよりソフトなものほど高感度で認識できることが分かった。結論として Cd^{II} 錯体化合物は中性緩衝液中において蛍光アニオンセンサーとして機能することが明らかとなった。

開発したセンサー化合物の有用性を示すために、酵素活性検出系への応用実験も行った。酵素としては環状ヌクレオチドのリン酸ジエステル結合を切断する phosphodiesterase 3':5'-cyclic nucleotide を選択した。 Cd^{II} 錯体化合物は AMP を高感度で検出するが、cAMP の検出感度は極めて低い。それ故、反応生成物である AMP の濃度の上昇を検出することで、酵素反応の進行をモニターすることが可能となる。この手法を用いて、酵素添加後における蛍光強度の変化をリアルタイムで捉えることに成功した。

以上、要するに本研究において、水上は二種類のアニオンホストを用いてセンサー分子のデザイン・合成を行い、これまで困難とされてきた水溶液中において機能するアニオンセンサーの開発に成功した。特に、大環状ポリアミン-金属錯体をアニオンホストとして有する蛍光アニオンセンサー (Cd^{II} 錯体化合物) は、pH 7.4 の 100 mM HEPES 緩衝液中においても十分に機能することが分かった。さらに、このセンサー分子の応用として、ホスホジエステラーゼの活性検出に成功した。このセンサー分子の更なる改良によって、生物学研究などにおいて有用な新たなセンサー分子の開発に繋がると考えられる。これらの成果は分析化学、生物有機化学に広く貢献するものであり、博士(薬学)の学位論文として十分な価値があるものと認められる。