

論文

ダンシルグリシン修飾シクロデキストリンの 生理活性物質に対する分子認識センサー能

濱田文男*・石川匡子*・秋山葉子*・上野昭彦**

Host-Guest Sensory System of Dansyl-Modified Cyclodextrin for
Detecting Bioactive-Compounds by Dansyl Fluorescence

Fumio HAMADA*, Kyoko ISHIKAWA*
Yoko AKIYAMA*, and Akihiko UENO**

Abstract

Dansyl-modified β -, γ -cyclodextrins (**1** and **2**) have been prepared as a sensor for detecting bioactive-organic compounds such as steroids and alkaloids. **1** shows pure monomer fluorescence whose intensity is decreased upon addition of guest species. However, **2** shows two types of pure monomer fluorescence, that is, one is the same for the case of **1**, the other is whose intensities is enhanced upon addition of guest species. This guest-induced variation in the fluorescence intensity suggests that the dancylglycine moiety acts as a spacer which enables the cyclodextrin to form 1:1 host complexing by narrowing the large γ -cyclodextrin cavity. The value $\Delta I/I^0$, where I and I^0 are fluorescence intensities in the presence and absence of a guest and ΔI is $I^0 - I$ is fluorescence parameter. **1** exhibits higher selective and sensitive molecular recognition ability for steroids and alkaloids except for lithocholic acid than does **2**.

1. はじめに

従来, 有機化合物の物理化学的検出方法として, 紫外可視分光法, 蛍光法, 電気化学法などが用いられているが, いずれも検出対象となる化合物自体が分光学的あるいは電気化学的な活性を有する必要があった。一方, シクロデキストリンは D-グルコピラノースを構成単位とする環状オリゴマーでありドーナツ形をした有機ホスト分子として知られ, 水溶液中で自らの空孔に種々のゲスト分子を取り込み包接

化合物形成を行うことが知られている⁽¹⁾。しかしシクロデキストリンはそれ自体が分光学的に不活性であり, ゲスト化合物を取り込み包接化合物を形成しても光学的吸収や蛍光発生などの変化は示さず, 化合物検出に適用出来る可能性はなかった。そのため, シクロデキストリンの包接化合物形成に関する研究は光学的活性なゲスト分子を用い包接形成に伴う蛍光スペクトルあるいは吸収スペクトルの変化より検討するのが常道であった。しかしながら, シクロデキストリンに発色団を化学的に修飾することで本来的には光学的吸収や蛍光性を示さないシクロデキストリンが分光学的に活性になり得ることが考えられる。近年, 我々はシクロデキストリンにナフタレン⁽²⁾, アントラセン⁽³⁾, ピレン⁽⁴⁾, フェロセン⁽⁵⁾, スピロピラン⁽⁶⁾, アゾベンゼン⁽⁷⁾単位を化学的に修飾した修飾シクロデキストリンを合成しその包接挙動について検討した。その結果, ゲスト包接に伴い修飾シクロデキストリンの円二色性あるいは蛍光スペ

1993年6月25日受理

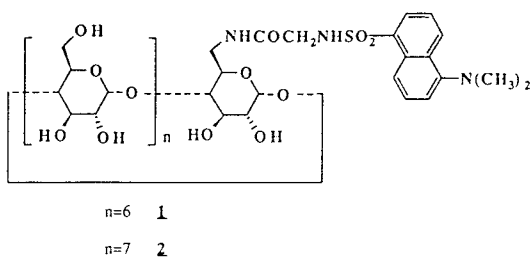
*秋田大学鉱山学部物質工学科

Department of Materials Engineering and Applied Chemistry, Mining College, Akita University.

**東京工業大学生命理工学部生物工学科

Department of Bioengineering, Faculty of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology.

クトルが変化することを報告してきた。これら変化の大きさは個々のゲスト分子により異なることより、修飾シクロデキストリンの分子認識センサーとしての可能性を意味するものである。我々は蛍光活性を有するダンシルグリシン修飾 β -シクロデキストリン(1)を合成し数々の生理活性を有することで知られるステロイド⁽⁸⁾に対して高選択-高感度センサーを報告した^{(9),(10)}。今回さらにダンシルグリシン修飾 γ -シクロデキストリン(2)を合成しステロイドに対するセンサー能及び1及び2の薬理活性を有する植物塩基-アルカロイド⁽⁸⁾に対しての分子認識センサー能について検討したので報告する。



2. 実 験

2.1 ダンシルグリシン修飾 β -シクロデキストリン(1)の調製:

N,N-ジメチルホルムアミド 60 ml とダンシルグリシン 1.0 g (3.24 mmol) との混合物を約 -10°C に冷却し、その混合物にジシクロヘキシルカルボジイミド 0.75 g (3.63 mmol) を添加し、30 分間攪拌した。次に、6-デオキシーアミノ- β -シクロデキストリン⁽⁸⁾ 1.1 g (0.95 mmol) を加え、更に 30 分間攪拌した。反応液を室温に戻し、一晚攪拌を続けた。反応液を濃縮し、多量のアセトンを加え、得られた沈澱を単離した。沈澱物をアセトンにて洗浄してから水を加え、水不溶部を除き、水可溶部を集めた。この水可溶部を濃縮し、アセトンで再び沈澱させ、乾燥後メチルアルコールで洗浄しメチルアルコール可溶部を除いた。メチルアルコール不溶部を少量の水に溶解し、CM-セファデックスカラム (2.5 \times 40 cm) に通導した。最初に不純物が溶出し、その後目的生成物が溶出した。これを集めて濃縮し、アセトンで再沈し目的物 110 mg (Yield: 9%) を得た。

Rf=0.5 (1-ブタノール/エタノール/水=5:4:3)
 IR (KBr): 3350, 2930, 1705, 1665, 1575, 1550, 1413, 1365, 1330, 1232, 1155, 1080, 1030, 945, 850 (cm^{-1}),

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 3.2-3.75 (44H, br, CH_2 and シクロデキストリン-H) 2.84 (6H, s, NMe_2), 4.5 (6H, m, O_6H), 4.85 (7H, s, C_1H), 5.65-5.9 (14H, br, O_2H and O_3H), 7.26(1H, d, Ar-H), 7.60 (2H, br, Ar-H), 8.28 (1H, d, Ar-H), 8.45 (1H, d, Ar-H), Found: C, 46.63; H, 6.08; N, 2.23; S, 1.93%. Calcd. for $\text{C}_{56}\text{H}_{87}\text{O}_{37}\text{N}_3\text{S}\cdot\text{H}_2\text{O}$: C, 46.47; H, 6.25; N, 2.91; S, 2.22%. MS (FAB): 1424 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

ダンシルグリシン修飾 γ -シクロデキストリン(2)の調製:

化合物(1)の調製法に準ずる。Yield: 22%.
 Rf=0.39 (1-ブタノール/エタノール/水=5:4:3)
 IR (KBr): 3350, 2930, 1670, 1572, 1550, 1412, 1330, 1240, 1155, 1080, 1027, 940, 852, 788, 758 (cm^{-1}), $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 : $\text{D}_2\text{O}=4:1$)
 δ : 3.25 (6H, s, NMe_2), 3.4-4.2 (50H, br, CH_2 and シクロデキストリン-H), 4.4-4.5 (23H, br, O_2H , O_3H , and O_6H), 5.2-5.35 (8H, br, C_1H), 7.65 (1H, d, Ar-H), 7.98 (2H, q, Ar-H), 8.45 (1H, d, Ar-H), 8.62 (1H, d, Ar-H), 8.86 (1H, d, Ar-H), Found: C, 46.86; H, 6.10; N, 2.60; S, 2.35%. Calcd. for $\text{C}_{62}\text{H}_{95}\text{O}_{42}\text{N}_3\text{S}$: C, 46.94; H, 6.04; N, 2.65; S, 2.02%. MS (FAB): 1586 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

2.2 ステロイド、アルカロイドに対する分子認識センサー能の測定:

蛍光光度計は島津 RF-500 型を使用。蛍光強度の測定は以下の条件で実施した。温度は 25°C 、励起波長は 370 nm に設定。ホスト濃度は $2.12 \times 10^{-6}\text{M}$ から $3.49 \times 10^{-6}\text{M}$ (10%ジメチルスルホキシド-水 (v/v)) までの物を使用し、ゲスト濃度はリトコール酸の場合を除きゲスト化合物のジメチルスルホキシド溶液を 0.1 mM とするように添加した。

3. 結果と考察

γ -シクロデキストリンは β -シクロデキストリンと比較してその分子サイズは大きくそのため包接挙動は両者の間で多くの場合、異なる挙動を示すことが知られている。既に、我々はピレン修飾 γ -シクロデキストリンがゲスト非存在の場合は二量体として存在しゲスト添加により1対1包接化合物形成を行うことをモノマー蛍光あるいはエキシマー蛍光スペクトルの変化より報告している⁽⁴⁾。ダンシルグリシン修飾 β -シクロデキストリン(1)の10%ジメチルスルホキシド溶液での1-ボルネオールの添加あるいは無添加での蛍光スペクトル変化を Fig. 1 に示す。スペクトル強度はゲスト無添加で 535 nm で最

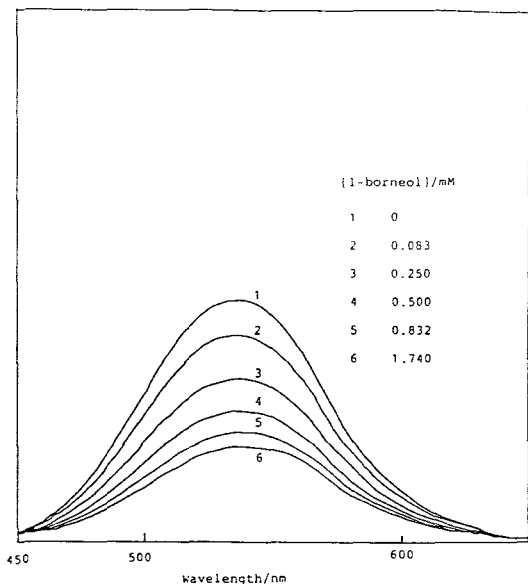


Fig. 1 Fluorescence spectra of **1** ($2.25 \times 10^{-6} \text{M}$) in a 10% dimethyl sulfoxide aqueous solution in the absence and presence of 1-borneol. Excitation wavelength was 370 nm.

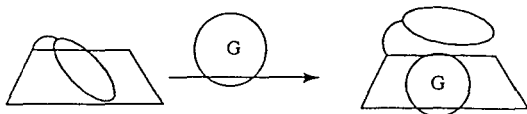


Fig. 2 Induced-fit type of complexation of modified cyclodextrin with a pendant moiety acting as a hydrophobic cap for inclusion of a guest molecular (G) in the cyclodextrin cavity.

大値を示し1-ボルネオールの添加量増加に伴い減少していることが判る。このことは、ダンシル部分がゲスト包接に伴いシクロデキストリン疎水性空孔内から親水性の空孔外へと疎水性残基として機能しながら放出されることを意味しており、我々はこのような包接挙動を適合誘導 (Induced-fit Type) 型として報告している (Fig. 2)⁽¹¹⁾。また蛍光強度の変化の現象は酵素あるいはミセル中の疎水性環境下でダンシル単位の蛍光強度が増大する事実と一致している⁽¹²⁾。

ここでゲスト非存在での化合物**1**の蛍光強度を I^0 、ゲスト添加時の蛍光強度を I 、 I^0 と I の差を ΔI とするならば $\Delta I/I^0 (=K)$ は分子認識能の感度評価因子として用いることが出来る。

Fig. 3に10種のステロイドに対する化合物及び

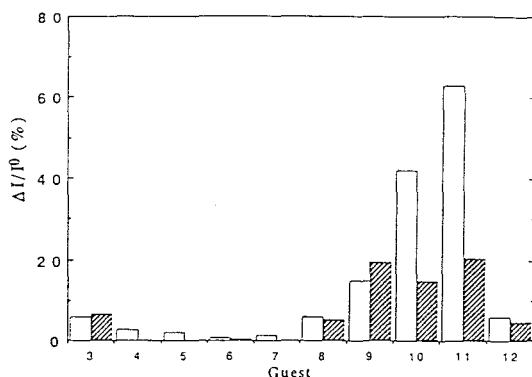


Fig. 3 The sensitivity factor $\Delta I/I^0$ (%) of **1** ($2.21 \times 10^{-6} \text{M}$) (\square) and **2** ($2.26 \times 10^{-6} \text{M}$) (\blacksquare) for various steroidal guests.

2のKを示した。化合物**1**はケノデオキシコール酸(10)、ウルソデオキシコール酸(11)にたいしてそれぞれKが41.9及び63.3%と高い値を示した。しかしこれらステロイドと1個の水酸基の位置が異なるデオキシコール酸(8)に対しては5.9%と低い感度を示したにすぎない。水酸基の1個少ないリトコール酸(9)は溶解性が低いことから0.01 mmolの濃度で使用したにも拘らず14.8%と高い感度を示した。また水酸基がさらに1個多いコール酸(12)に対してはほとんど感度は示さなかった。このことよりゲスト分子の極性の増加が感度の低下に影響していることが考えられる。2あるいは3個の水酸基を有するケトステロイド群にはほとんど感度を示さなかった。水酸基を有しないプロゲステロン(3)は6.7%と幾分高い感度を示した。化合物**2**の場合、デオキシコール酸、ウルソデオキシコール酸に対しては**1**の場合と同様高い選択性を示した。しかしその感度は14.8及び20.5%を示し低下した。しかしながらリトコール酸の場合、0.01 mmol濃度添加で感度が19.5%と**1**の場合に比較して高い値を示し、他のステロイドの場合と逆の結果を示し興味深い。

アルカロイドに対するKについてFig. 4及び5に示した。Fig. 4においては化合物**1**、Fig. 5においては**2**の場合について示している。**1**の場合、蛍光ピークは535 nm、**2**の場合、540 nmにて測定した。化合物**1**はキニーネ、キニジンに対して高い感度を示した。他のアルカロイドに対してはほとんど感受性を示さなかった。包接化合物形成のメカニズムは1-ボルネオールをゲスト分子とした場合と同様な形態で進行していることが判る。即ちゲスト添加により蛍光強度は減少している。一方、化合物**2**では非常

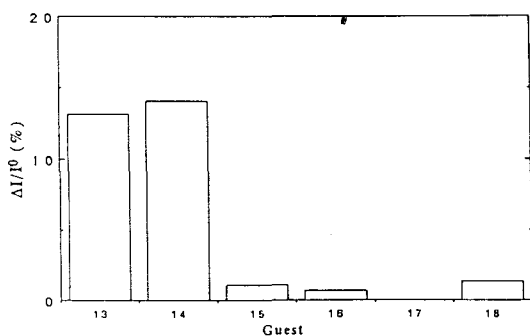
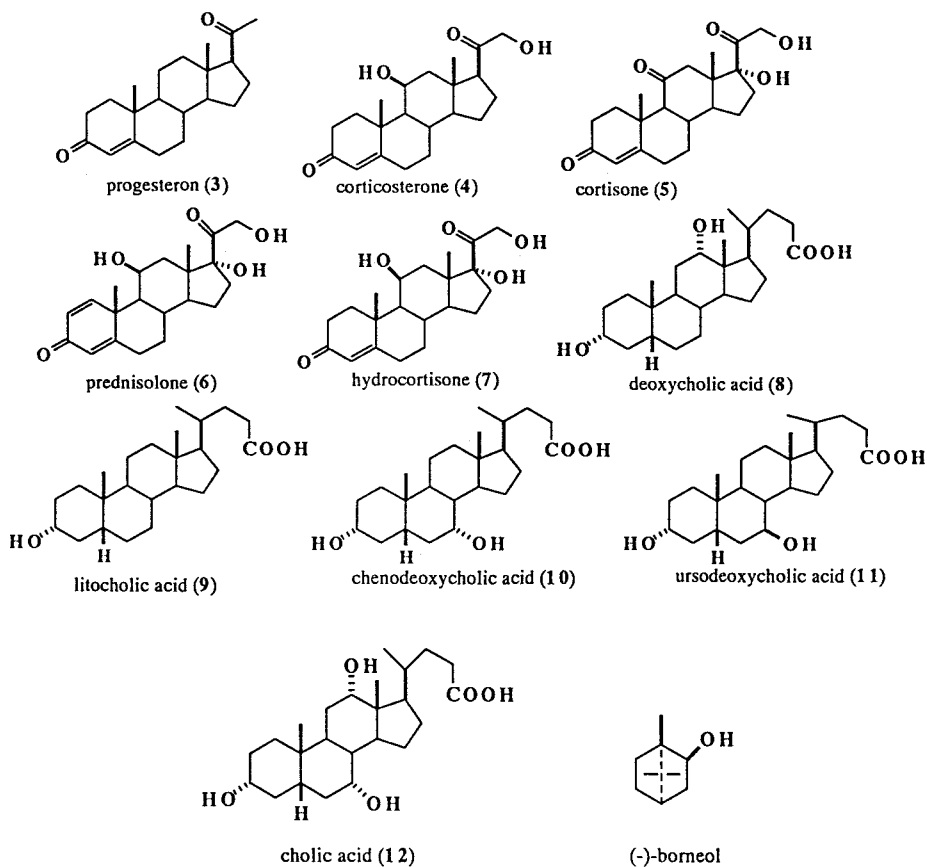


Fig. 4 The sensitivity factor $\Delta I/I^0$ (%) of 1 (2.25×10^{-6} M) for various alkaloidal guests.

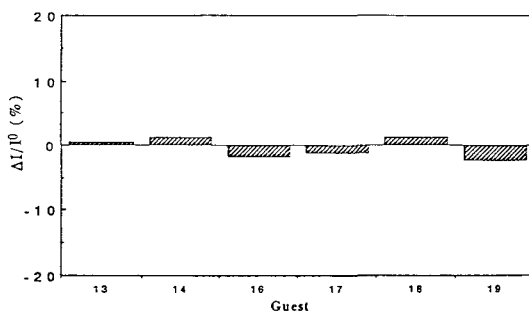


Fig. 5 The sensitivity factor $\Delta I/I^0$ (%) of 2 (3.49×10^{-6} M) for various alkaloidal guests.

に弱い感度を示し選択性も弱いことが明らかとなったがナルコチン (16), ロベリン (17) の場合, K が負の値を示した. このことは, ゲスト包接に伴い蛍

光強度が増加したことを意味する. 即ち, ダンシル部分が広すぎる γ -シクロデキストリン空孔を狭くするようなスペーサーとして機能しゲスト分子とダ

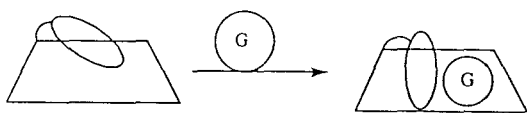
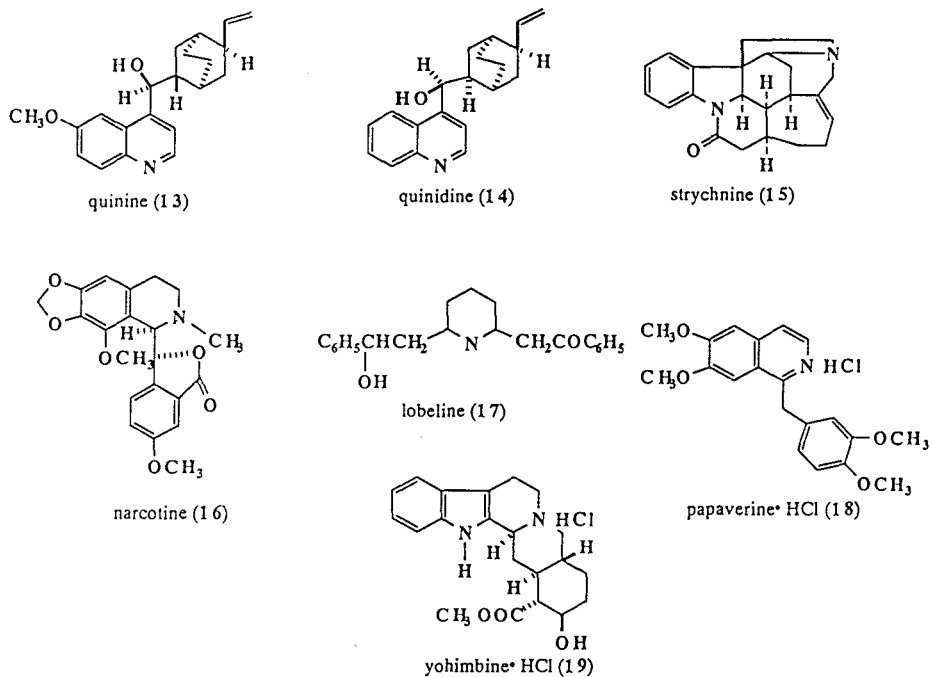


Fig. 6 Induced-fit type of space regulation by the appended moiety for inclusion of a guest molecular (G) in the cyclodextrin cavity.

ンシル基が共に空孔内に入り込むというメカニズムで進行していることが推定される。(Fig. 6) この現象は Wang 等のダンシル誘導体でも観察されている⁽¹³⁾。

4. 結 論

ダンシル修飾シクロデキストリンのステロイド、アルカロイドに対するセンサー能は β -シクロデキストリン誘導体の場合においてより高い選択性と感度を示した。しかし、ダンシル修飾 γ -シクロデキストリンの場合、アルカロイドに対して感度が4%以下と低い値を示しており、ケノデオキシコール酸、ウルソデオキシコール酸、リトコール酸などの感度の大きいステロイドの検出に際し、アルカロイドの混在下でも測定の可能性を意味している。蛍光を用いる本検出法は光吸収や電気化学的手法による検出

法と比較して、高感度を実現することができるので、ゲスト希薄溶液で可能である。更に、ダンシル修飾シクロデキストリンは、ゲスト化合物の分子形状や大きさを測定ないし推定することが出来ると考えられる。

参 考 文 献

- (1) M.L. Bender and M. Komiyama, "Cyclodextrin Chemistry" Springer-Verlag (1978).
- (2) A. Ueno, Y. Tomita, and T. Osa, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1983, 976; A. Ueno, F. Moriwaki, T. Osa, F. Hamada, and K. Murai, *Tetrahedron*, **43**, 1571 (1987).
- (3) A. Ueno, F. Moriwaki, T. Osa, F. Hamada, and K. Murai, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 4323 (1988); A. Ueno, F. Moriwaki, A. Azuma, and T. Osa, *J. Org. Chem.*, **54**, 295 (1989).
- (4) A. Ueno, I. Suzuki, and T. Osa, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 6391 (1989).
- (5) A. Ueno, F. Moriwaki, T. Matsue, T. Osa, F. Hamada, and K. Murai, *Makromol. Chem., Rapid Commun.*, **6**, 231 (1985).
- (6) F. Hamada, M. Fukushima, T. Osa, and A. Ueno,

- Makromol. Chem., Rapid Commun.*, **14** 279 (1993).
- (7) F. Hamada, M. Fukushima, T. Osa, H. Ikeda, F. Toda, and A. Ueno, *Makromol. Chem., Rapid Commun.*, **14**, 287 (1993).
- (8) 高木敬次郎, 小澤 光: 薬物学, 南山堂 (1976).
- (9) A. Ueno, S. Minato, I. Suzuki, M. Fukushima, M. Ohkubo, T. Osa, F. Hamada, and K. Murai, *Chem. Lett.*, **1990**, 605.
- (10) F. Hamada, Y. Kondo, R. Ito, I. Suzuki, T. Osa, and A. Ueno, *J. Incl. Phenom.*, **00**: 1-7 (1993).
- (11) A. Ueno, F. Moriwaki, T. Osa, F. Hamada, and K. Murai, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 4323 (1988).
- (12) W. Rettig, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **25**, 971 (1986).
- (13) Y. Wang, T. Ikeda, A. Ueno, and F. Toda, *Chem. Lett.*, **1992**, 863.