

## 分子を識別する

— 蛍光性人工レセプターの設計とその機能 —

Molecular Recognition—Design and Function of Artificial Fluorescent Receptors

務 台 俊 樹\*・荒 木 孝 二\*

Toshiki MUTAI and Koji ARAKI

「Biomimetic Chemistry (生体模倣の化学)」が提唱されてから四半世紀、近年では生体にとらわれない、機能性ホストの開発が盛んとなっている。ここでは、分子認識の情報を、蛍光応答という形に変換する機能を持つ分子素子—蛍光応答性レセプター—について報告する。

## 1. 緒 言

## 1.1 分子認識とは

「認識」とは「物事を見定め、その意味を理解すること」である。化学の分野では、ある分子もしくは分子集合体(ホスト)が、特定の分子(ゲスト)のみを選択して会合する過程を「分子認識」という。これはホストがゲストの分子構造を見定める過程であり、その手段となるのはホスト—ゲスト間に働くさまざまな分子間相互作用である。このとき、分子間相互作用に基づく安定化が最大となるホスト—ゲストの組み合わせ、つまりホスト—ゲスト間に立体的・相互作用的に相補性(complementarity)のある組み合わせが選択され、会合体を形成する。分子間相互作用には、静電相互作用、水素結合、疎水性相互作用、分散力、電荷移動相互作用などがあるが、いずれも有機分子などを形成する共有結合より弱い。しかし、複数の分子間相互作用が協同的(cooperative)かつ集中的(convergent)に働くことによって、高い精度の分子認識が可能となり、ホスト—ゲスト会合にともなう安定化が非常に大きくなる<sup>1)</sup>。生体では、このような分子認識を基礎として、情報処理や化学反応が行われている。たとえば、副腎皮質刺激ホルモン(分子量約4500のポリペプチド分子)は、多様な物質が混在する血流中に、わずか100 pg/ml以下しか存在しない。しかし、その存在量が極めて微量であっても、標的細胞上の副腎皮質刺激ホルモンの受容体に特異的に結合して、標的細胞の機能を制御する。また、生体内で化学反応を触媒する酵素も、その活性部位(かぎ穴)にぴったりはまる基質(かぎ)に対してのみ、反応を触媒する。このような特異

性の極めて高い分子認識は、いずれも上に挙げた種々の分子間相互作用が精密に集積化された結果に他ならない。

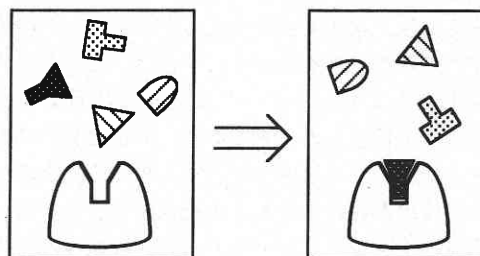


図1 酵素活性部位(かぎ穴)と基質(かぎ)の会合モデル

## 1.2 認識応答と人工レセプター

分子認識による選択的で構造の定まった分子会合体の形成は、単にゲスト分子の構造を見定めるだけでなく、新たな機能の発現を可能にする。実際に酵素では、最適化された構造を持つ酵素—基質複合体の形成によって、引き続き効率のよい化学結合組換え(化学反応)が実現されている。またレセプターへの情報伝達物質の結合は、さまざまな細胞応答を誘起し、標的細胞への情報伝達が達成される。つまり「認識」により引き起こされる「応答」との組み合わせ、「認識応答」により、高度で多様な生体機能が発現されている。

1970年代初頭に、この素晴らしい生体機能を人工的に合成した分子を用いて実現できないか、という動きが現われ、「Biomimetic Chemistry (生体模倣の化学)」<sup>2)</sup>と呼ばれる新たな学問領域が誕生した。当初は、生体内の酵素反応を、モデル系により化学的に再現することを主眼として提唱されたが、次第にその対象は生体膜や核酸といった他

\*東京大学生産技術研究所 第4部

の生体物質・組織に拡大していった。さらに、単なる生体反応の再現にとどまらず、センサー、反応触媒、医薬品など生体機能を越えた応用研究も精力的に行われ、実用化も進んでいる。

我々の研究室では、認識応答とその制御を目指した研究を進めており、分子輸送系などについてはすでに紹介した<sup>3)</sup>。今回は、認識と蛍光応答を組み合わせた光応答性人工レセプターの開発に関する研究を紹介する。

さまざまな物質が混合した試料中の特定物質を、定性的あるいは定量的に測定しようとするとき、目的物質のみを選択的に識別するホスト分子があれば、分離操作が不要となるため効率のよい測定が可能となる。そのため、これまでに数多くの人工レセプターが開発され、特定物質の選択的検出のためのセンサーシステムに利用されている。このとき人工レセプターに要求されるのは、1. ゲストとの強い結合能、2. 特異性の高いゲスト認識能、というホスト機能に加えて、3. 認識情報の高感度発信（測定側からみれば検出能）という、分子レベルでの情報を検出可能な情報に変換する機能である。

認識情報を検出する手段としては、イオン濃度や電極活性物質を電気化学的に検出する方法、化学発光を示す反応を利用する方法、ゲスト会合にともなうホストの吸光度変化などが、これまで多く利用されてきた。しかし近年、蛍光を利用した人工レセプター<sup>4)</sup>が大きな注目を集めている。蛍光は分子種からの発光であり、分子会合の情報が直接的に蛍光応答の形で反映される。このため、究極的には分子一つの検出が可能となる。また単純なシステムでも非常に高感度なセンシングが可能であり、吸収スペクトル法と比較して1000分の1以下の濃度が比較的容易に検出できる。

## 2. 蛍光性人工レセプターの設計とその機能

### 2.1 蛍光性人工レセプターの分子設計

蛍光性人工レセプターは、ゲスト認識をおこなうホスト部分と、蛍光応答部分とから構成される。

ホスト部分は、ゲストを取り込むポケットとしての機能と、ゲストを認識・会合する機能とを合わせ持つ。ポケットは、疎水場を提供するシクロデキストリンやシクロファンのような包接化合物、リジッドな骨格としての芳香族化合物などを「部品」として構築する。これに、認識・会合を司る各種の静電相互作用部位や、アミノ基・水酸基・カルボニル基等の水素結合部位を適切な位置に配置し、共有結合で組み上げることでホスト部分を設計する。

蛍光応答部分の設計にあたって重要なかぎとなるのは、いかにしてホスト-ゲスト会合形成を蛍光変化に結びつけるかという点であり、いくつかの手法が存在する。たとえば、ホスト部分に蛍光色素を共有結合でつないだ人工レ

セプターは、ゲスト会合によるホスト部分のコンホメーション変化が、蛍光色素の周囲環境変化を引き起こし、蛍光変化につなげる。また、ゲストとの相互作用部位が蛍光色素に直接結合したレセプターは、静電相互作用や水素結合形成で誘起される蛍光色素の電子状態変化によって、蛍光応答を示す。あるいはゲスト会合にともなう、レセプターの光誘起電子移動効率の変化を利用する方法もある。いずれにせよ、どのスキームを採用するかにより、レセプター全体の構造が決定される。

もう一つの課題は、いかに蛍光変化を大きくするか、つまりいかに情報変換効率を大きくするかという点であるが、これまでの蛍光性人工レセプターは、この点で有利だとは必ずしも言えない。これについての方法論は確立されておらず、最近ではさまざまな相互作用を組み合わせることで、情報変換効率の向上が試みられている。

### 2.2 発光部位を持たせたクラウンエーテル<sup>5)</sup>

クラウンエーテルは、酸素を複数個持つ環状エーテルで、その直径とちょうどよい大きさのカチオンと比較的強く相互作用することが知られている。たとえば、18-クラウン-6-エーテルは $K^+$ や $NH_4^+$ と選択的に相互作用する(図2)。

そこで図2(b)に示すような、ホスト部分として18-クラウン-6-エーテル、蛍光部位として芳香族イミドを持つ化合物を合成し、蛍光性人工レセプターとしての機能を調べた。レセプターのメタノール溶液に、ゲストとしてアルカリ金属イオン( $Li^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Rb^+$ ,  $Cs^+$ )をそれぞれ加えていったところ、レセプターの吸収スペクトルが変化し、ホスト-ゲストの会合が確認された。レセプターの発光(470 nm)は、 $K^+$ を加えた場合に最も大きな増加が観測された。この結果から、このレセプターはアルカリ金属イオンの大きさの違いを認識し、その情報を発光強度の変化という形に変換することが確認された。

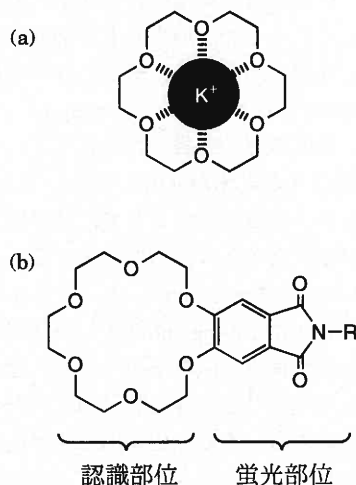


図2 (a) 18-クラウン-6-エーテルに $K^+$ が取り込まれた様子。  
(b) クラウンエーテルを認識部位とする蛍光性レセプター。

レセプターの発光増加は、金属カチオンを捕らえることによって、イミドの無放射失活過程が抑制されたためと考えられる。レセプターの認識部位である 18-クラウン-6-エーテルは、 $K^+$ と最も効率よく相互作用するため、他のアルカリ金属イオンと比較してイミドの無放射失活過程を強く抑制し、結果として大きな発光増加を誘起するものと思われる。

### 2.3 ゲスト会合によるホストの分子内電荷移動の制御と発光変化<sup>6)</sup>

化合物 PQ は、メトキシフェニル (D) とキノリン (A) という二つの芳香環をアミドで結合した構造で、キノリン環窒素とアミド二つの合計三つの水素結合部位を持つ (図 3)。単独では青色と緑色の二色発光が観測され、緑色の発光は D から A への分子内電荷移動に基づくものである。分子内電荷移動の効率、D-A 間のアミド結合の回転と密接に関係する。

よってアミドの回転を阻害すれば、この二色発光が変化するのではないかと考えた。すなわち PQ は、キノリン環窒素および 7 位アミド NH と同時に二本の水素結合を形成するゲストに対する、蛍光性レセプターとなると期待される。

上の条件を満たすゲストとして、核酸塩基の一つである

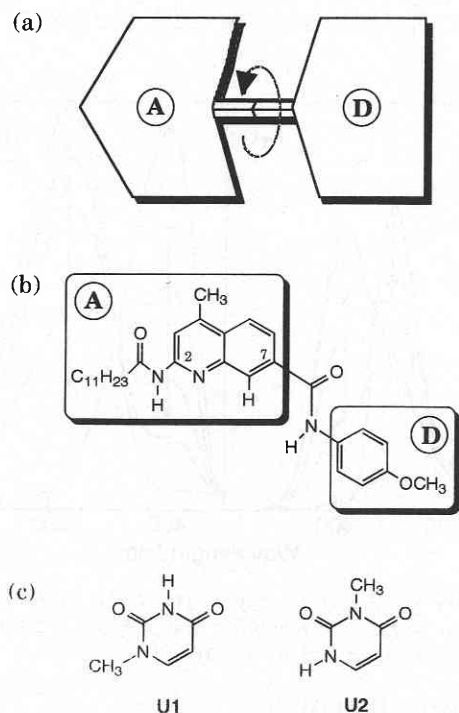


図 3 (a) レセプターの模式図。ドナー (D) とアクセプター (A) を結ぶ結合は回転可能である。(b) 二色発光を示すレセプター PQ。ドナーとアクセプターは、アミドで結合されている。(c) ウラシル誘導体ゲスト U1, U2。

ウラシルの誘導体 U1 を PQ の溶液に加えたところ、PQ の吸収スペクトルは等吸収点を示しながら変化し、蛍光の増加が見られた。また、 $^1H-NMR$  スペクトルから、PQ と U1 との間で三重水素結合が形成されることが明らかとなった。その会合体構造は図 4 のようであり、PQ のキノリン環窒素および 7 位アミド NH と、ゲスト U1 との間で形成された二本の水素結合によって、芳香環を結合するアミドの回転が抑制されていることがわかる。このため PQ は平面に固定化され、蛍光強度の増加が起きると考えられる。

一方、条件を満たさないウラシル誘導体 U2 を加えた場合、PQ の吸収、蛍光スペクトルとも変化は見られなかったが、 $^1H-NMR$  スペクトルによって、ゲスト U2 は、PQ のキノリン環窒素および 2 位のアミドとの二重水素結合を形成することが明らかとなった (図 5)。PQ は U2 と会合体を形成するものの、アミド回転を阻害するようなモードではないことから、蛍光の変化はまったく観測されない、すなわち PQ が応答しないものと考えられる。

以上の結果から、PQ が、分子内回転 (この場合は二つの芳香環をつなぐアミド結合の回転) を規制するようなゲストに対してのみ蛍光変化をします、蛍光性人工レセプターとなることが明らかとなった。

### 2.4 静電相互作用と水素結合を組み合わせた人工レセプター<sup>7)</sup>

精密な分子認識をおこなう過程で、水素結合が重要な役

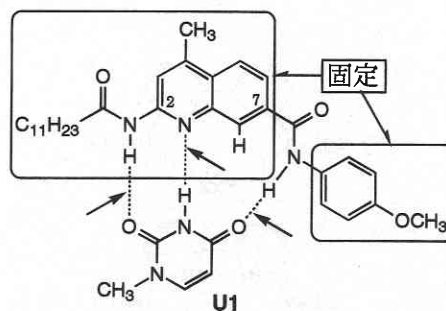


図 4 PQ と U1 の会合体。三重水素結合 (矢印) によりホストのアミドの回転は固定される。

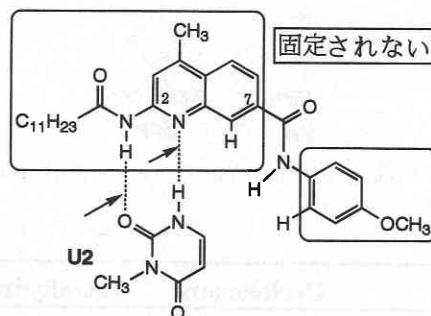


図 5 PQ と U2 の会合体。二本の水素結合 (矢印) が形成されるがホストのアミド回転は抑制されない。

割を果たすことはすでに述べた。しかし、水素結合が蛍光色素の電子状態に与える影響は一般に小さいことから、分子認識の情報を、蛍光変化の形に効率よく変換することは難しい。一方、静電相互作用はより強い相互作用であり、イオン性結合の形成によって蛍光の大きく変化する化合物は、数多く報告されている。そこで、水素結合部位、静電相互作用部位の両方を持つ分子を設計し、高感度かつ高選択性を示す蛍光性人工レセプターの開発を試みた。

レセプター Hx2 の分子構造を図 6 に示す。ジアミノピペリジン誘導体 (Hx2) は、静電相互作用が可能な環窒素を二つと、その両側に水素結合部位となるアミノ基を持ち、Hx2 単独では効率のよい青色蛍光しめす。<sup>8)</sup>

リン酸ジエステルと脂肪酸は、代表的な二種類の疎水性生体物質であるが、そのモデル化合物であるジフェニルリン酸 (DPP) とヘキサ酸 (HA) をゲストとして選んだ (図 6)。ホスト Hx2 の有機溶液に DPP を加えていくと、Hx2 の吸収スペクトルは等吸収点を示しながら大きく変化した。このことから Hx2 と DPP は 1:1 で会合し、Hx2 の環窒素がプロトン化されたことがわかった。等吸収点で励起すると、Hx2 の蛍光スペクトルは 430 nm 付近 (青色) のピークが大きく減少し、それとともに、プロトン化された Hx2 由来の蛍光帯が 500 nm 付近 (緑色) に現れた (図 7)。一方、DPP の代わりに HA を加えた場合は、吸収スペクトル変化は非常に小さく、青色蛍光の減少は見られたが、

緑色蛍光は観測されなかった。スペクトル変化から求めたレセプターとの会合定数は、DPP がいずれの有機溶液中でも  $3 \times 10^4 \sim 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  と大きな値が得られたのに対し、HA は最大でも  $77 \text{ M}^{-1}$  と非常に小さな値であった (表 1)。この結果から、Hx2 が DPP と HA を識別し、DPP と高選択的に相互作用して蛍光変化を起こすことが明らかとなった。また、吸収変化と蛍光変化から求めた会合定数はよく一致したことから、蛍光変化は、Hx2 とゲストの会合を反映したものであることが確認された。なお酸性プロトンを持たない化合物 (リン酸トリエステル、脂肪酸エステル、アルコール、ケトン) については、Hx2 との会合は見られなかった。

つぎに、アミノ基の水素をすべてアルキル置換して水素結合部位をなくしたレセプター Pr4 を合成し、DPP との相互作用を検討した。極性溶媒中での DPP との会合定数は  $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  と大きく、Hx2 とそれほど差のない値が得られた。極性の大きい溶媒中では水素結合の効果は限定的で、溶媒和による会合体の安定化効果が大きいことを示唆している。これに対し、非極性溶媒中での会合定数は  $2 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$  で、Hx2 と比較して  $10^5$  倍も小さかった。非極性溶媒中では溶媒和効果が小さいことから、DPP との水素結合形成の可否が会合定数の大きな差に表れたと思われる。すなわち、Hx2 は溶媒和による会合体安定化の減少を、水素結合形成によって補うことができるのに対し、

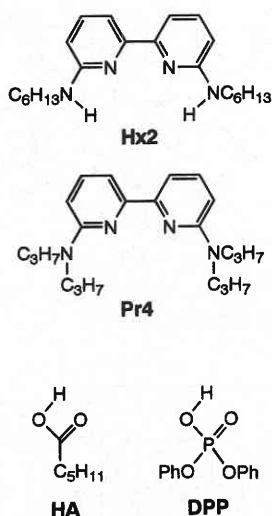


図 6 レセプター Hx2, Pr4 と、ゲスト DPP, HA

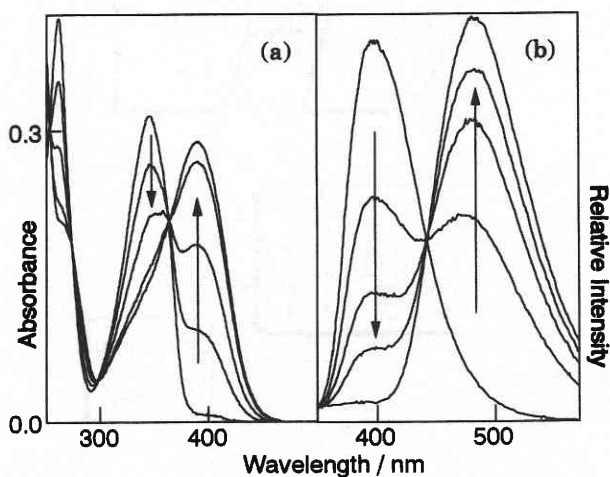


図 7 DPP を加えていったときの、Hx2 の (a) 吸収スペクトル、(b) 蛍光スペクトル変化。青色蛍光の大きな減少と、緑色蛍光の大きな増加が見られる。

表 1 レセプター Hx2・Pr4 と、ゲスト DPP の会合定数 ( $K/\text{M}^{-1}$ )

	Cyclohexane	Tetrahydrofuran	Acetone	Acetonitrile	Dichloromethane
<b>Hx2</b>	$1.7 \times 10^7$	$3.0 \times 10^4$	$3.2 \times 10^5$	$1.7 \times 10^7$	$4.5 \times 10^7$
<b>Pr4</b>	$2.0 \times 10^2$	1x10	$9.1 \times 10^3$	$4.2 \times 10^6$	$6.6 \times 10^6$

Pr4 は DPP と水素結合を形成できないために、溶媒和効果の低下が会合定数の大きな減少に直結したと考えられる。以上の結果から、Hx2 の静電相互作用部位と水素結合部位を同時に持つことによる特徴は次のようにまとめられる。まず静電相互作用部位の効果として、強い会合体形成を可能にしたこと、会合体形成による大きな蛍光変化を実現したことが挙げられる。水素結合部位の効果としては、会合体の、特に非極性溶媒中での安定化への寄与、そしてアミノ基を複数持つことによる多重水素結合形成が可能であることが挙げられる。

Hx2 と DPP の会合機構を、図 8 にモデルで示した。単独のレセプター Hx2 は、ゲスト DPP を取り込むポケットを形成しておらず、相互作用部位は互いに異なる方向を向いている。ここに DPP が存在すると、Hx2 のコンホメーションが変化してポケットを形成し、相互作用部位もゲスト DPP に対して適切な位置に配置され、Hx2 と DPP の会合体が形成されるのである。

吸収・蛍光スペクトル変化の形状および<sup>1</sup>H-NMR スペクトル等の測定結果から、会合体の構造を図 9 のように推定した。DPP と会合することで Hx2 の環窒素がプロトン化し、Hx2 のアミノ基の水素と DPP の酸素との間で水素結合を形成する。極性の大きな溶媒中では、溶媒和による会合体の安定化効果が働く。

レセプター Hx2 が、さまざまな有機溶媒中でリン酸ジエステルを選択的に認識して大きな会合定数を示すとともに、大きな蛍光変化を示すことを明らかにした。このことから、Hx2 がリン脂質と脂肪酸という生理的に最も重要な疎水性生体物質を識別し、リン脂質と選択的に相互作用し

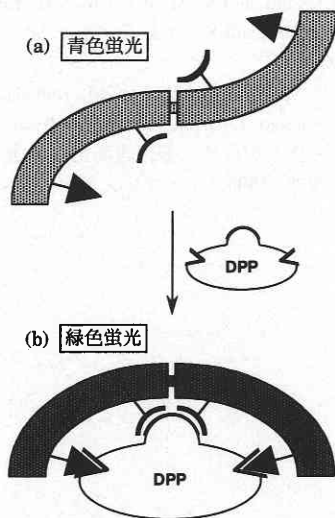


図 8 Hx2 による DPP の分子認識。(a) フリーの Hx2。四つの相互作用部位は互いに異なる方向にあり、青色蛍光を示す。(b) 四つの相互作用部位が協同的に働くことで、Hx2 は DPP と強く会合し、蛍光が緑色に変化する。

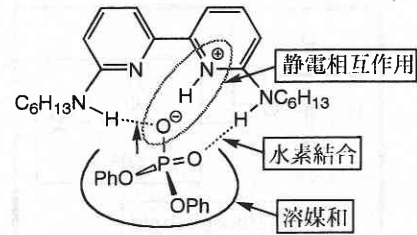


図 9 Hx2 と DPP の会合体の構造。Hx2 の環窒素はプロトン化し、アミノ水素は DPP と水素結合を形成する。極性溶媒中では、溶媒和による会合体の安定化が起こる。

て蛍光変化を起こす蛍光素子となる可能性がある。

## 2.5 リン脂質の検出

2.4 では、Hx2 のリン酸ジエステルと脂肪酸に対する応答性の顕著な違いを紹介した。ここでは、より応用的な面からのアプローチとして、グリセロリン脂質に対する Hx2 の蛍光応答性について検討をおこなった。

リン脂質は最も重要な疎水性生体物質の一つで、生体膜を構成する主成分(約 40%)である。生体膜は、細胞の境界を定める隔壁としてのみならず、細胞内外の情報伝達や膜結合性酵素の土台など、さまざまな機能を果たしている。<sup>9)</sup> また、膜という集合体としての機能に加えて、個々のリン脂質も各種の生体反応に関与している。図 10 に示すように、グリセロリン脂質は、極性部分の構造によって中性(PC, PE)と酸性(PG, PI, PS)に分類される。これら Hx2 の有機溶液に加えたときの蛍光変化を調べた。

中性の PC, PE を加えた場合、レセプター Hx2 の吸収・蛍光スペクトルは共に全く変化を示さなかったことから、Hx2 は PC, PE に対して応答しないことが確認された。これに対し、酸性の PG, PS を加えると、2.4 で観測されたのと同様に Hx2 の青色蛍光は減少し、緑色蛍光が大きく増加した。490 nm における蛍光強度は約 20 倍となり、しかもその増加量は、PG, PS の濃度に対してほぼ直線的であった(図 11)。この結果は、Hx2 が酸性グリセロリン脂質 PG, PS に対して、選択的に、大きく、かつ定量的な蛍光応答を示すことを表しており、さらに検討を加えることで PG, PS の高感度蛍光センサーとしての応用が可能になるものと期待される。

従来法と比較すると、吸光スペクトル法や、薄層クロマトグラフィー(TLC)による分離定量法よりも、格段に高感度かつ良好な定量が可能となろう。また、現在最も高感度な比色定量法と比較すると、感度も上回るほかに、定量操作がはるかに簡便になると考えられる。

## 3. 終わりに

本稿では、いくつかの蛍光性人工レセプターとその情報変換機構について、センサーとしての応用の観点を変えて

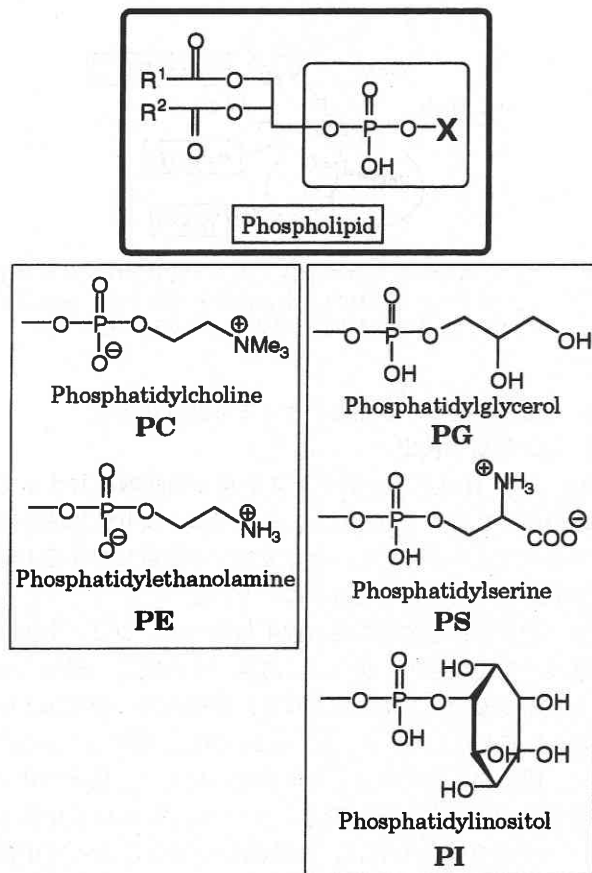


図10 中性グリセロリン脂質と酸性グリセロリン脂質の分子構造

紹介した。これ以外にもさまざまな例が報告されており、課題であった情報変換効率やS/N比の悪さも、多様な新しい物理化学的「仕掛け」が提案された結果、改善されつつある。しかし、分子設計の自由度を考えると、今後も多様かつ高性能なレセプターが誕生することは想像に難くない。

蛍光性人工レセプターは、ホスト対ゲストの、一分子対一分子の相互作用を直接観測できるという特性をもつ。こ

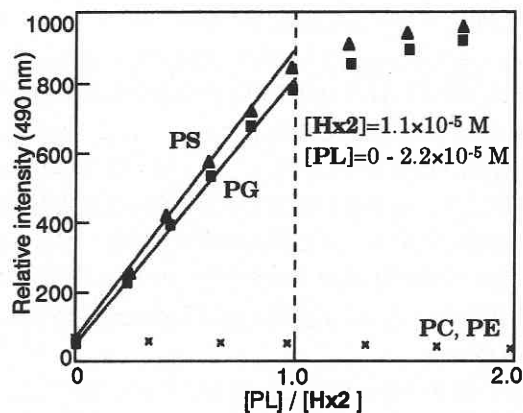


図11 グリセロリン脂質を加えていった際のHx2の蛍光強度(490 nm)変化。

のため、センサーという第一義的な応用にとどまらず、分子情報に基づく光スイッチング、あるいは化学反応と組み合わせた機能性分子として可能性が広がるものと期待される。

(1998年1月12日受理)

## 参 考 文 献

- 1) 小宮山 真・荒木孝二, 分子認識と生体機能, 1989, 朝倉書店.
- 2) 日本化学会 編, 化学総説, 1982, 35, 学会出版センター.
- 3) 荒木孝二, 李 成吉, 生産研究, 1996, 48, 21; 大月 稜, 荒木孝二, 生産研究, 1997, 49, 1.
- 4) A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, T. Gunnlaugsson, A. J. M. Huxley, C. P. McCoy, J. T. Rademacher, and T. E. Rice, *Chem. Review*, 1997, 97, 1515.
- 5) J. Otsuki, T. Yamagata, and K. Araki, unpublished result.
- 6) M. Abe, J. Otsuki, and K. Araki, *Chem. Lett.*, 1993, 1541.
- 7) T. Mutai, Y. Abe, and K. Araki, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1997, 1805.
- 8) K. Araki, T. Mutai, Y. Shigemitsu, M. Yamada, T. Nakajima, S. Kuroda, I. Shimao, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1997, 613.
- 9) ロバート・B・ゲニス 著, 西島正弘 他訳, 生体膜一分子構造と機能, 1990, シュプリンガー・フェアラーク東京.