

様式 F - 7 - 1

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）実施状況報告書（研究実施状況報告書）（平成28年度）

1. 機関番号 

1	4	6	0	3
---	---	---	---	---

 2. 研究機関名 奈良先端科学技術大学院大学

3. 研究種目名 挑戦的萌芽研究 4. 補助事業期間 平成27年度～平成29年度

5. 課題番号 

1	5	K	1	2	7	4	8
---	---	---	---	---	---	---	---

6. 研究課題名 次世代チオクロモン型ケージド化合物の創成と新規細胞セレクション法の開発

## 7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
6 0 1 5 2 5 9 2	カキウチ キヨミ 垣内 喜代三	物質創成科学研究科	教授

## 8. 研究分担者

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名

## 9. 研究実績の概要

本研究では、我々のチオクロモン型光解離性保護基（TCM）を用いた新規ケージド化合物を合成し、光照射（アンケーシング）により、保護されていた生命分子が機能を復元する時期と場所を高度に制御するだけでなく、その保護基がアンケーシング時に極めて強い蛍光を発する四環性化合物へ変換されるという特性を最大に活かして、その蛍光強度測定による脱保護反応進行度の定量化を行う。さらに、その成果を新規細胞セレクション法の開発に応用することを目的とした。

昨年度に、TCMケージドアンチセンス分子がルシフェラーゼの発現に影響を与えなかったのに対し、光照射下ではアンケーシングが進行し、アンチセンス分子としての機能が復元し、ルシフェラーゼの発現が抑制されていることを見出した。しかしながら、本年度での詳細な検討より、蛍光性を示す極めて複雑な中間体を経て本反応が進行し、アンケーシングの効率も低く、ケージドアンチセンス分子の合成効率が低いことから、研究の続行を断念した。

一方、ルシフェラーゼ阻害剤として知られているレスベラトールの三つの水酸基をTCMでマスクしたケージド体の詳細な検討を行い、2-もしくは3-ケージド体を用いて、光照射によるアンケーシングを行った結果、照射時間とともに四環性化合物の蛍光発光は増大し、これに相関してルシフェラーゼ阻害能が増強していくことを見出した。しかし、これらケージドレスベラトールの水溶性が低く、水溶液中でのアンケーシングの効率が非常に低いことが判明し、今後、水溶性を有するTCMの開発を目指す必要があった。

さらに、水溶性分子でコレステロールを選択的に取り込むシクロデキストリン（CD）に着目し、TCMケージドメチルCDを合成することで、水溶液中での反応を検討した。現時点で、水溶液中でアンケーシングがスムーズに進行し、同時に蛍光発光強度の増加も見られる予備的知見が得られている。

## 10. キーワード

- |          |               |               |                 |
|----------|---------------|---------------|-----------------|
| (1) 生体分子 | (2) ケージド化合物   | (3) チオクロモン誘導体 | (4) アンチセンスオリゴ核酸 |
| (5) 水溶性  | (6) シクロデキストリン | (7) コレステロール   | (8)             |

## 11. 現在までの進捗状況

(区分)(3) やや遅れている。

(理由)

ケージドアンチセンスの検討では、光照射によるアンケーシング時に形成される発光性中間体の構造決定に多くの時間を費やしたため、他の展開に遅れがでた。一方で、低分子の生理活性分子であるレスベラトールのアンケーシングでは、蛍光発光の増加度合いと生理活性の発現に極めて高い相関性があることを見出し、蛍光測定による生理活性の復元の定量化に成功した。しかしながら、この定量化は有機溶媒中で観察されるものの、水溶液中ではTCMの水溶性の低さによりアンケーシングの進行が遅いという結果を得、我々のチオクロモン型光解離性保護基に水溶性を付与する新たな課題が見つかった。一方で、水溶性の生理活性分子であるシクロデキストリン誘導体への展開では、予備的検討で、水溶液中でもアンケーシングが進むことが判明している。このように、フローサイトメトリーへの展開までにはさらに若干の時間が必要で、やや遅れていると思われる。

## 12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)

今後については、水溶性チオクロモン型光解離性保護基を開発し、それを用いたケージド分子の機能を調査し、水中でのアンケーシングと蛍光発光特性に相関性がみられることが確認できれば、フローサイトメトリーへの応用の可能性を検討する予定としている。これらの結果を踏まえ、光照射により細胞内でアンケーシングされ、機能が抑制されている細胞のみをアンケーシング時の蛍光を指標にしたフローサイトメトリーによりセレクションするという最終目標の達成を目指す。

(次年度使用額が生じた理由と使用計画)

(理由)

細胞内評価への展開を予想しそれに伴う試薬の購入を予定していたが、蛍光を発する中間体の構造決定に時間を要した。また、ターゲット分子としてレスベラトールを選択し、我々が開発したチオクロモン型光解離性保護基を用いたケージドレスベラトールの合成と光脱保護反応を検討した。有機溶媒中では反応の進行、すなわち生理活性の復元を蛍光強度で定量的に評価できたが、チオクロモン型光解離性保護基の疎水性が高く、したがって疎水性のケージド化合物の水に対する難溶性も向上し、水溶液中では反応効率が非常に悪かった。水溶性向上には保護基の改良が必要であり、その検討に日数を要することから、年度内の計画完了は困難となった。

(使用計画)

すでにケージドアンチセンス分子のアンケーシング時の複雑な中間体の構造決定は完了し、次年度は、水溶性チオクロモン型光解離性保護基の開発に必要な経費とともに、細胞実験など当初予定していた試薬の購入などに充てる。

(課題番号： 15K12748 )

(注) ・印刷に当たっては、A4判(縦長)・両面印刷すること。

## 13. 研究発表 (平成 28 年度の研究成果)

〔雑誌論文〕 計 (2) 件 / うち査読付論文 計 (2) 件 / うち国際共著 計 (2) 件 / うちオープンアクセス 計 (0) 件

著 者 名		論 文 標 題				
Youlai Zhang, Huan Zhang, Chi Ma, Junru Li, Yasuhiro Nishiyama, Hiroki Tanimoto, Tsumoru Morimoto, and Kiyomi Kakiuchi		Study of the Paterno-Buchi Type Photolabile Protecting Group and Application to Various Acids				
雑 誌 名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著	
Tetrahedron Letters	有	57	2   0   1   6	5179-5184	該当する	
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)						
10.1016/j.tetlet.2016.09.065						
オープンアクセス						
オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難						

著 者 名		論 文 標 題				
Chi Ma, Youlai Zhang, Huan Zhang, Junru Li, Yasuhiro Nishiyama, Hiroki Tanimoto, Tsumoru Morimoto, and Kiyomi Kakiuchi		Synthesis and Photochemistry of a New Photolabile Protecting Group for Propargylic Alcohols				
雑 誌 名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著	
Synlett	有	28	2   0   1   7	560-564	該当する	
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)						
10.1055/s-0036-1588915						
オープンアクセス						
オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難						

〔学会発表〕 計 (7) 件 / うち招待講演 計 (0) 件 / うち国際学会 計 (3) 件

発 表 者 名		発 表 標 題	
Shin Hikage, Yasuo Sasaki, Yasuhiro Nishiyama, Kiyomi Kakiuchi		Control of an Enzyme Reaction Using Caged Resveratorol Having Thiochromone-Type Photolabile Protecting Group	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所	
26th IUPAC International Symposium on Photochemistry (国際学会)	2016年04月03日 ~ 2016年04月08日	大阪中央公会堂 (大阪府・大阪市)	

発表者名	発表標 題	
日影新、佐々木康雄、西山靖浩、垣内喜代三	蛍光測定を利用した生理活性発現の定量評価	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
第37回光化学若手の会	2016年06月17日 ~ 2016年06月19日	アイアイランド (大阪府・四条畷市)

発表者名	発表標 題	
Shin Hikage, Yasuhiro Nishiyama, Kiyomi Kakiuchi	Monitoring of the bioactivity with fluorescence emission generated by photoirradiation of caged compounds	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
2016年光化学討論会	2016年09月06日 ~ 2016年09月08日	東京大学駒場キャンパス (東京都・目黒区)

発表者名	発表標 題	
高橋克洋、日影新、西山靖浩、垣内喜代三	ケージドシクロデキストリンを用いたコレステロール包接能の光制御	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
第60回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会	2016年10月29日 ~ 2016年10月31日	東京農業大学オホーツクキャンパス (北海道・網走市)

発表者名	発表標 題	
Shin Hikage, Yasuhiro Nishiyama, Kiyomi Kakiuchi	Development of The Second Generation of Thiochromone-type Photolabile Protecting Groups	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
The 10th International Symposium on Integrated Synthesis (ISONIS-10) (国際学会)	2016年11月18日 ~ 2016年11月19日	淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県・淡路市)

発 表 者 名	発 表 標 題	
Yasuhiro Nishiyama, Shin Hikage, Katsuhiro Takahashi, Kiyomi Kakiuchi	Monitoring of the Bioactivity Recovery with Fluorescence Emission Generated by Photoirradiation to Caged Compounds	
学 会 等 名	発 表 年 月 日	発 表 場 所
9th Asian and Oceanian Photochemistry Conference (APC2016) (国際学会)	2016年12月04日 ~ 2016年12月08日	Nanyang Technological University (Singapore)

発 表 者 名	発 表 標 題	
西山靖浩、日影新、高橋克洋、前原渉平、垣内喜代三	蛍光測定による新規ケージド化合物からの生理活性機能復元能評価	
学 会 等 名	発 表 年 月 日	発 表 場 所
日本化学会第97春季年会	2017年03月16日 ~ 2017年03月19日	慶應大学日吉キャンパス (神奈川県・横浜市)

〔図書〕 計(0)件

著 者 名	出 版 社	
書 名	発 行 年	総 ページ 数

14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

〔出願〕 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別

〔取得〕 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別
				出願年月日	

## 15. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計(0)件

国際研究集会名	開催年月日	開催場所

## 16. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

(1) 国際共同研究：-

## 17. 備考

奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科 反応制御科学研究室  
<http://mswebs.naist.jp/LABs/kakiuchi/index-j.html>