

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-52863

(P2017-52863A)

(43) 公開日 平成29年3月16日(2017.3.16)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C09B 57/00 (2006.01)	C09B 57/00	Z 4H050
C07F 9/6568 (2006.01)	C07F 9/6568	CSP
C09K 11/06 (2006.01)	C09K 11/06	

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 25 頁)

(21) 出願番号 特願2015-177520 (P2015-177520)
 (22) 出願日 平成27年9月9日(2015.9.9)

(71) 出願人 504139662
 国立大学法人名古屋大学
 愛知県名古屋市千種区不老町1番

(74) 代理人 110000796
 特許業務法人三枝国際特許事務所

(72) 発明者 山口 茂弘
 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内

(72) 発明者 多喜 正泰
 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内

(72) 発明者 小笠原 宏亮
 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内

Fターム(参考) 4H050 AA01 AB91 AB92

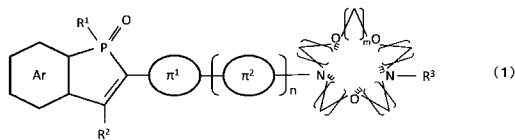
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ホスホール化合物及びそれを含有する蛍光色素

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 今までにない光学的性質を有するホスホール化合物の提供。

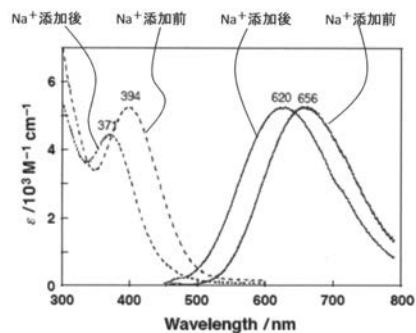
【解決手段】 式(1)で表されるホスホール化合物。



(R¹ はアルキル基、アリール基等；R² はH、アリール基、F等；R³ はH、アリール基等；Arは置換/非置換の炭化水素芳香環等；nは0又は1；mは1~3の整数；¹及び²は共役ユニットで、共役ユニットは2価のアルケニル基、2価の炭化水素芳香環等；右端の環構造は¹又は²のうちホスホール骨格側へ電子を供与可能な位置に結合)

【効果】 大員環部位がNa結合能力を持ち、Na⁺が大員環部位に結合することにより蛍光極大波長が短波長側にシフトする。

【選択図】 図1

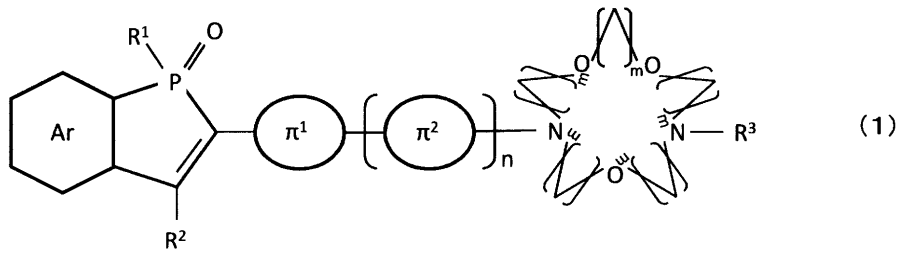


【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記式 (1) :

【化 1】

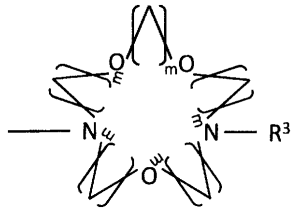


10

(式(1)中、 R^1 はアルキル基、置換アルキル基、アリール基、置換アリール基、アルコキシ基、ヒドロキシ基、アミノ基又は置換アミノ基であり、 R^2 は水素原子、アルキル基、置換アルキル基、アリール基、置換アリール基、カルボニル基、イミノ基、シアノ基又はフッ素原子であり、 R^3 は水素原子、アルキル基、置換アルキル基、アリール基又は置換アリール基であり、 Ar は炭化水素芳香環、置換炭化水素芳香環、ヘテロ芳香環又は置換ヘテロ芳香環であり、 n は0又は1であり、 m は1~3の整数であり、 π^1 及び π^2 は同じであっても異なってもよい共役ユニットであって、該共役ユニットは、2価のアルケニル基、2価の置換アルケニル基、2価のアルキニル基、2価の置換アルキニル基、2価の炭化水素芳香環、2価の置換炭化水素芳香環、2価のヘテロ芳香環又は2価の置換ヘテロ芳香環であり、

20

【化 2】



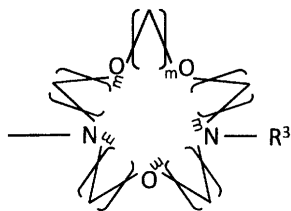
30

は π^1 又は π^2 のうちホスホール骨格側へ電子を供与可能な位置に結合している)で表されるホスホール化合物。

【請求項 2】

R^1 はアリール基又は置換アリール基であり、 R^2 は水素原子、アリール基又は置換アリール基であり、 R^3 はアルキル基、置換アルキル基、アリール基又は置換アリール基であり、 Ar はベンゼン環又はナフタレン環であり、 n はゼロであり、 m は2であり、 π^1 はベンゼン環であり、

【化 3】



40

はベンゼン環である π^1 のパラ位に結合している、請求項1に記載のホスホール化合物。

【請求項 3】

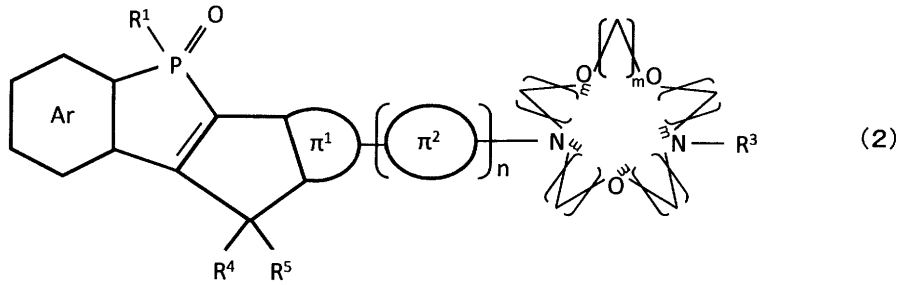
R^3 は、アリール基又は置換アリール基である、請求項2に記載のホスホール化合物。

【請求項 4】

下記式(2) :

50

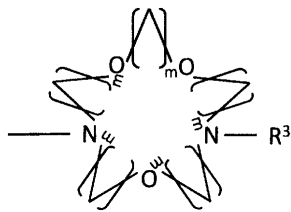
【化 4】



(式(2)中、 R^1 はアルキル基、置換アルキル基、アリール基、置換アリール基、アルコキシ基、ヒドロキシ基、アミノ基又は置換アミノ基であり、 R^3 は水素原子、アルキル基、置換アルキル基、アリール基又は置換アリール基であり、 R^4 及び R^5 は同じであっても異なってもよく、水素原子、アルキル基、置換アルキル基、アリール基又は置換アリール基であり、Arは炭化水素芳香環、置換炭化水素芳香環、ヘテロ芳香環又は置換ヘテロ芳香環であり、 n は0又は1であり、 m は1~3の整数であり、 π^1 及び π^2 は同じであっても異なってもよい 共役ユニットであって、該 共役ユニットは、2価の炭化水素芳香環、2価の置換炭化水素芳香環、2価のヘテロ芳香環又は2価の置換ヘテロ芳香環であり、

10

【化 5】



20

は π^1 又は π^2 のうちホスホール骨格側へ電子を供与可能な位置に結合している) で表されるホスホール化合物。

【請求項 5】

R^1 はアリール基又は置換アリール基であり、 R^3 はアルキル基、置換アルキル基、アリール基又は置換アリール基であり、 R^4 及び R^5 は同じものであって、アルキル基、置換アルキル基、アリール基又は置換アリール基であり、Arはベンゼン環又はナフタレン環であり、 n はゼロであり、 m は2であり、 π^1 はベンゼン環である、請求項4に記載のホスホール化合物。

30

【請求項 6】

R^3 は、アリール基又は置換アリール基である、請求項5に記載のホスホール化合物。

【請求項 7】

請求項1~6のいずれか1項に記載のホスホール化合物を含有する蛍光色素。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

本発明は、ホスホール化合物及びそれを含有する蛍光色素に関する。

【背景技術】

【0002】

蛍光性有機化合物は、有機EL素子の発光材料又は生体蛍光イメージングのための蛍光色素として重要であり、これまでに報告された例は、基礎研究及び応用の両面で枚挙に暇がない。中でも、周囲の環境によって蛍光色が劇的に変化する色素(例えばアクリロダン)は、蛍光プローブの中でも部位特異的な可視化に実用化されている。このような蛍光特性を実現するためには、電子供与性の高い(ドナー型) 共役ユニットと電子受容性の高い(アクセプター型) 共役ユニットを組み合わせるといふ分子設計が有効であることが

50

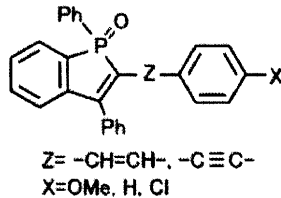
多く示されている。得られる蛍光色素の発光色又は発光効率、および溶媒効果の大きさは、ドナーおよびアクセプターにどのような共役ユニットを用いるかに大きく依存する。一方で、近年、新たな電子受容性共役ユニットとして、ホスホール化合物が注目されつつある。例えば、非特許文献1には、2-アルケニルベンゾ[b]ホスホールオキシド及び2-アルキニルベンゾ[b]ホスホールオキシドの合成例と共にそれらの光学データが報告されている。また、非特許文献2には、2-アリールベンゾ[b]ホスホールオキシドの合成例と共にこれらの電気化学特性が報告されている。非特許文献1及び2に記載された化合物の一例を以下に示す。

【0003】

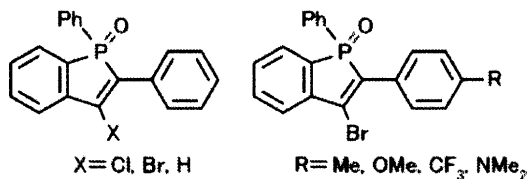
【化1】

10

【非特許文献1】



【非特許文献2】



20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Organic Letters, 2013, vol.15, No.17, p4458-4461

【非特許文献2】Chem. Asian J., 2009, vol.4, p1729-1740

【発明の概要】

30

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

溶媒の極性に依じて発光色が劇的に変化する従来の化合物は、多くが極性の低い溶媒中では強い発光を示すものの、極性の高いアルコールなどのプロトン性溶媒中では発光がみられない。このため、今までにない光学的性質を有する環境応答性の蛍光化合物の開発が望まれていた。

【0006】

本発明はこのような課題を解決するためになされたものであり、今までにない光学的性質を有するホスホール化合物を提供することを主目的とする。

【課題を解決するための手段】

40

【0007】

上述した課題を解決するために、本発明者らは、種々の新規なホスホール化合物を合成し、その光物性を調べたところ、ある種のホスホール化合物が今までにない光学的性質を有することを見だし、本発明を完成するに至った。

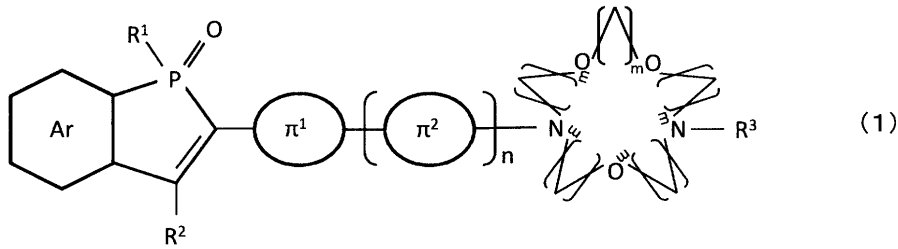
【0008】

即ち、本発明は、下記項1～項7に示すホスホール化合物及び蛍光色素に係る。

1. 下記式(1):

【0009】

【化 2】



【0010】

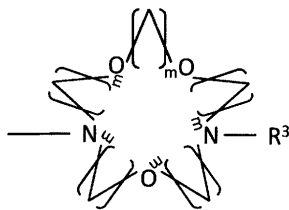
(式(1)中、 R^1 はアルキル基、置換アルキル基、アリール基、置換アリール基、アルコキシ基、ヒドロキシ基、アミノ基又は置換アミノ基であり、 R^2 は水素原子、アルキル基、置換アルキル基、アリール基、置換アリール基、カルボニル基、イミノ基、シアノ基又はフッ素原子であり、 R^3 は水素原子、アルキル基、置換アルキル基、アリール基又は置換アリール基であり、 Ar は炭化水素芳香環、置換炭化水素芳香環、ヘテロ芳香環又は置換ヘテロ芳香環であり、 n は0又は1であり、 m は1~3の整数であり、 1 及び 2 は同じであっても異なってもよい共役ユニットであって、該共役ユニットは、2価のアルケニル基、2価の置換アルケニル基、2価のアルキニル基、2価の置換アルキニル基、2価の炭化水素芳香環、2価の置換炭化水素芳香環、2価のヘテロ芳香環又は2価の置換ヘテロ芳香環であり、

10

【0011】

20

【化 3】



【0012】

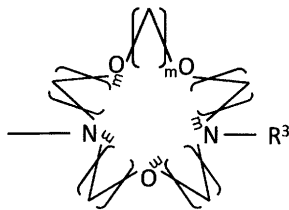
は 1 又は 2 のうちホスホール骨格側へ電子を供与可能な位置に結合している)で表されるホスホール化合物。

30

2. R^1 はアリール基又は置換アリール基であり、 R^2 は水素原子、アリール基又は置換アリール基であり、 R^3 はアルキル基、置換アルキル基、アリール基又は置換アリール基であり、 Ar はベンゼン環又はナフタレン環であり、 n はゼロであり、 m は2であり、 1 はベンゼン環であり、

【0013】

【化 4】



40

【0014】

はベンゼン環である 1 のパラ位に結合している、上記項1に記載のホスホール化合物。

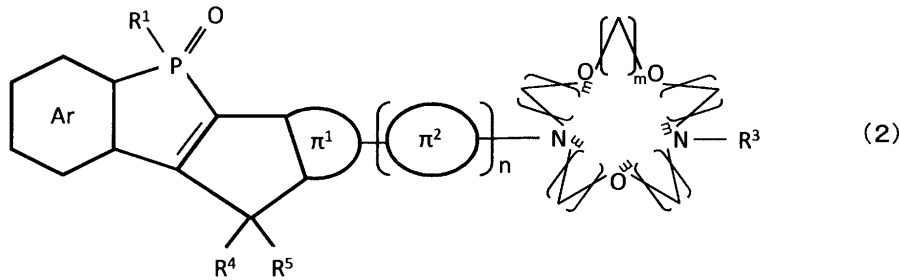
3. R^3 は、アリール基又は置換アリール基である、上記項2に記載のホスホール化合物。

4. 下記式(2)：

【0015】

50

【化5】



【0016】

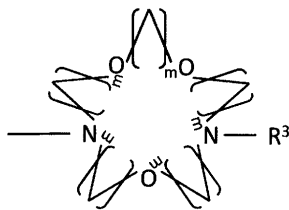
10

(式(2)中、 R^1 はアルキル基、置換アルキル基、アリール基、置換アリール基、アルコキシ基、ヒドロキシ基、アミノ基又は置換アミノ基であり、 R^3 は水素原子、アルキル基、置換アルキル基、アリール基又は置換アリール基であり、 R^4 及び R^5 は同じであっても異なってもよく、水素原子、アルキル基、置換アルキル基、アリール基又は置換アリール基であり、 Ar は炭化水素芳香環、置換炭化水素芳香環、ヘテロ芳香環又は置換ヘテロ芳香環であり、 n は0又は1であり、 m は1~3の整数であり、 π^1 及び π^2 は同じであっても異なってもよい共役ユニットであって、該共役ユニットは、2価の炭化水素芳香環、2価の置換炭化水素芳香環、2価のヘテロ芳香環又は2価の置換ヘテロ芳香環であり、

【0017】

20

【化6】



【0018】

30

は π^1 又は π^2 のうちホスホール骨格側へ電子を供与可能な位置に結合している)で表されるホスホール化合物。

5. R^1 はアリール基又は置換アリール基であり、 R^3 はアルキル基、置換アルキル基、アリール基又は置換アリール基であり、 R^4 及び R^5 は同じのものであって、アルキル基、置換アルキル基、アリール基又は置換アリール基であり、 Ar はベンゼン環又はナフタレン環であり、 n はゼロであり、 m は2であり、 π^1 はベンゼン環である、上記項4に記載のホスホール化合物。

6. R^3 は、アリール基又は置換アリール基である、上記項5に記載のホスホール化合物。

7. 上記項1~6のいずれか1項に記載のホスホール化合物を含有する蛍光色素。

40

【発明の効果】

【0019】

本発明のホスホール化合物は、ナトリウムイオンの結合に伴い、蛍光極大波長が短波長側にシフトするという性質を有する。このような性質を有することから、本発明のホスホール化合物は、例えば、レシオイメージングを行うことにより、細胞内ナトリウムイオンの変化を定量的に解析することができる新たなタイプの蛍光プローブ用色素として利用できることが期待される。本発明のホスホール化合物は、イメージング画像取得時の405nmの可視光レーザー光源を使用できることから、生体へのダメージを大幅に軽減することができる。

【図面の簡単な説明】

【0020】

50

【図1】1% DMSOを含む50 mM HEPESバッファー (pH 7.4) 中におけるNa⁺の添加の前後でのNaGYの吸収スペクトル (破線) 及び発光スペクトル (実線) を示すグラフである。

【図2】(a)は、種々の濃度のNa⁺の存在下でのNaGY (25 μM) の発光スペクトルを示すグラフである。(b)は、Na⁺濃度と、575 nmと700 nmとの間の蛍光強度比 (I₅₇₅ / I₇₀₀) との関係を示すグラフである。

【図3】種々の金属イオンの添加にตอบสนองしたNaGYの金属イオン選択性を示すグラフである。

【図4】NaGY (25 μM) における、pHと、575 nmと700 nmとの間の蛍光強度比 (I₅₇₅ / I₇₀₀) との関係を示すグラフである。

【図5】NaGY (10 μM) を用いて可視化した細胞質のNa⁺レベルの増加に伴う生きたHeLa細胞の蛍光強度比イメージ (λ_{ex} = 405 nm) を示している。(a)は、ベースのDMEM培地を用いてインキュベートした細胞 (0分) であり、(b)は、140 mM Na⁺を含むK⁺フリーDMEMを用いてインキュベートした後の細胞 (35分) である。(c)は、細胞外K⁺の不在下でインキュベーション中の細胞の平均I₅₆₅₋₅₇₄ / I₆₆₂₋₆₈₉ (N > 20) の変化を示すグラフである。エラーバー = S.E. である。

【発明を実施するための形態】

【0021】

本発明のホスホール化合物は、上記式(1)又は上記式(2)で表されるものである。本発明のホスホール化合物は、電位を受け取る能力が高いホスホールP-オキシド部位と、電子を供与する能力が高い共役系ユニットを有しており、該共役系ユニットは、酸素原子及び窒素原子を含有する大員環部位を有している。この大員環部位がナトリウム結合能を有することから、本発明のホスホール化合物の大員環部位にナトリウムイオンが結合することにより、蛍光極大波長が短波長側にシフトする。

【0022】

R¹は、アルキル基、置換アルキル基、アリール基、置換アリール基、アルコキシ基、ヒドロキシ基、アミノ基又は置換アミノ基である。

【0023】

アルキル基としては、例えば、炭素数1~20の分岐を有していてもよいアルキル基及び環状のアルキル基が挙げられる。具体的には、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、イソブチル基、sec-ブチル基、tert-ブチル基、n-アミル基、イソアミル基、sec-アミル基、tert-アミル基、シクロプロピル基、シクロブチル基、シクロペンチル基、シクロヘキシル基などが挙げられる。置換アルキル基としては、例えば炭素数1~20の分岐を有していてもよいアルキル基及び環状のアルキル基のいずれか1つ以上の水素原子がハロゲン原子、シアノ基、ニトロ基、アミノ基、モノ又はジアルキルアミノ基、モノ又はジアリールアミノ基などで置換されたものが挙げられる。ハロゲン原子としては、例えばフッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子などが挙げられる。

【0024】

アリール基としては、例えば、フェニル基、トリル基、キシリル基、トリメチルフェニル基、ナフチル基、アントラセニル基などのほか、チエニル基、フリル基、ピリジル基などが挙げられる。置換アリール基としては、例えば、アリール基の1つ以上の水素原子がハロゲン原子、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アルコキシ基、カルボニル基、シアノ基、ニトロ基などで置換されたものが挙げられる。アルキル基の例示については、既に記載したとおりである。アルケニル基としては、例えば、エテニル基、プロペニル基、ブテニル基、イソブテニル基などが挙げられる。

【0025】

アルキニル基としては、例えば、エチニル基、プロピニル基、ブチニル基などが挙げられる。アルコキシ基は、-ORで表される基であり、ここではRはアルキル基のみならず

10

20

30

40

50

、アルキル鎖が酸素原子を介してエーテル結合した基、アルキル鎖にカルボキシル基が結合した基、アルキル鎖が -COO- を介してエステル結合した基等も含むものとする。具体的には、メトキシ基、エトキシ基、n-プロポキシ基、イソプロポキシ基、n-ブトキシ基、イソブトキシ基、sec-ブトキシ基、tert-ブトキシ基、 $-O((CH_2)_pO)_qCH_3$ (pは1~3の整数、qは1~10の整数)、 $-O-CH_2-COOH$ 、 $-O-CH_2-COOC_2H_5$ 、 $-O((CH_2)_r-COO)_sCH_3$ (rは1~3の整数、sは1~10の整数)などが挙げられる。

【0026】

カルボニル基は、例えば、フォルミル基、アシル基(メチルカルボニル基、エチルカルボニル基など)などが挙げられる。

10

【0027】

アミノ基は、 $-NH_2$ である。置換アミノ基としては、アミノ基の1つ以上の水素原子がアルキル基、置換アルキル基、アリアル基又は置換アリアル基で置換されたものなどが挙げられる。アルキル基、置換アルキル基、アリアル基、置換アリアル基の例示については、既に記載したとおりである。

【0028】

R^2 は水素原子、アルキル基、置換アルキル基、アリアル基、置換アリアル基、カルボニル基、イミノ基、シアノ基又はフッ素原子である。アルキル基、置換アルキル基、アリアル基、置換アリアル基、カルボニル基の例示については、既に記載したとおりである。イミノ基としては、例えば、アルキルイミノ基、置換アルキルイミノ基、アリアルイミノ基、置換アリアルイミノ基、スルホニルイミノ基などが挙げられる。スルホニルイミノ基は、イミノ基の窒素原子に $-SO_2R$ が結合したものであり、Rとしてはアルキル基、置換アルキル基、アリアル基、置換アリアル基などが挙げられる。イミノ基中のアルキル、置換アルキル等の例示は、既に記載したアルキル基、置換アルキル基等と同様である。

20

【0029】

R^3 は、水素原子、アルキル基、置換アルキル基、アリアル基又は置換アリアル基である。アルキル基、置換アルキル基、アリアル基、置換アリアル基の例示については、既に記載したとおりである。

【0030】

R^4 及び R^5 は同じであっても異なってもよく、水素原子、アルキル基、置換アルキル基、アリアル基又は置換アリアル基である。アルキル基、置換アルキル基、アリアル基、置換アリアル基の例示については、既に記載したとおりである。

30

【0031】

Arは炭化水素芳香環、置換炭化水素芳香環、ヘテロ芳香環又は置換ヘテロ芳香環である。

【0032】

炭化水素芳香環としては、例えば、ベンゼン環、ナフタレン環、アントラセン環、フェナントレン環などが挙げられる。置換炭化水素芳香環としては、例えば、炭化水素芳香環の1つ以上の水素原子がハロゲン原子、アルキル基、パーフルオロアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アルコキシ基、カルボニル基、シアノ基、ニトロ基などで置換されたものが挙げられる。パーフルオロアルキル基としては、例えばトリフルオロメチル基、ペンタフルオロエチル基などが挙げられる。その他の置換基の例示は既に記載したとおりである。

40

【0033】

ヘテロ芳香環としては、例えば、チオフェン環、チアゾール環、ピロール環、イミダゾール環、フラン環、オキサゾール環、ピリジン環などのほか、ヘテロ芳香環と炭化水素芳香環との縮合環、ヘテロ芳香環同士の縮合環などが挙げられる。置換ヘテロ芳香環としては、例えば、ヘテロ芳香環の1つ以上の水素原子がハロゲン原子、アルキル基、パーフルオロアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アルコキシ基、カルボニル基、シアノ基、ニトロ基などで置換されたものが挙げられる。これらの置換基の例示は既に記載したと

50

おりである。

【0034】

¹及び²は、同じであっても異なってもよい 共役ユニットであって、該 共役ユニットは、上記式(1)では、2価のアルケニル基、2価の置換アルケニル基、2価のアルキニル基、2価の置換アルキニル基、2価の炭化水素芳香環、2価の置換炭化水素芳香環、2価のヘテロ芳香環又は2価の置換ヘテロ芳香環であり、上記式(2)では、2価の炭化水素芳香環、2価の置換炭化水素芳香環、2価のヘテロ芳香環又は2価の置換ヘテロ芳香環である。

【0035】

アルケニル基としては、例えば、エテニル基、プロペニル基、ブテニル基、イソブテニル基などが挙げられる。置換アルケニル基としては、アルケニル基のいずれか1つ以上の水素原子がハロゲン原子で置換されたものなどが挙げられる。

10

【0036】

アルキニル基としては、例えば、エチニル基、プロピニル基、ブチニル基などが挙げられる。置換アルキニル基としては、アルキニル基のいずれか1つ以上の水素原子がハロゲン原子で置換されたものなどが挙げられる。

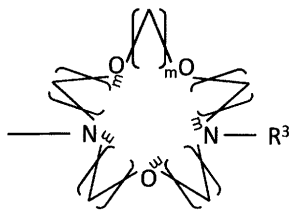
【0037】

炭化水素芳香環、置換炭化水素芳香環、ヘテロ芳香環及び置換ヘテロ芳香環の例示については、既に記載したとおりである。

【0038】

【化7】

20



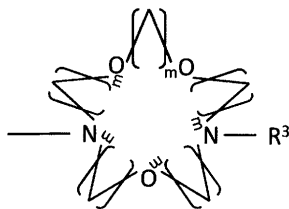
【0039】

は¹又は²のうちホスホール骨格側へ電子を供与可能な位置に結合している。例えば、式(1)では、nがゼロで¹がベンゼン環の場合、

30

【0040】

【化8】



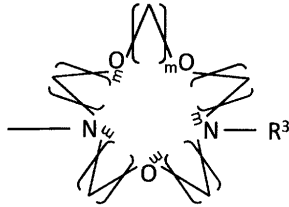
40

【0041】

はベンゼン環のパラ位に結合していることが好ましい。また、nが1で¹及び²がベンゼン環の場合には、²のベンゼン環は¹のベンゼン環のパラ位に結合し、

【0042】

【化 9】



【0043】

は 2 がベンゼン環のパラ位に結合していることが好ましい。

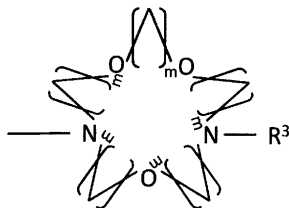
10

【0044】

R^1 はアリール基又は置換アリール基であることが好ましい。 R^2 は水素原子、アリール基又は置換アリール基であることが好ましい。 R^3 はアルキル基、置換アルキル基、アリール基又は置換アリール基であることが好ましい。 R^4 及び R^5 は同じものであって、アルキル基、置換アルキル基、アリール基又は置換アリール基であることが好ましい。 A はベンゼン環又はナフタレン環であることが好ましい。式(1)では、 n はゼロであり、 m は2であり、 1 はベンゼン環であり、

【0045】

【化10】



20

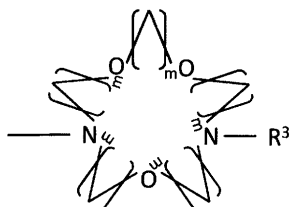
【0046】

はベンゼン環である 1 のパラ位に結合していることが好ましい。式(2)では、 n はゼロであり、 m は2であり、 1 はベンゼン環であり、

【0047】

30

【化11】



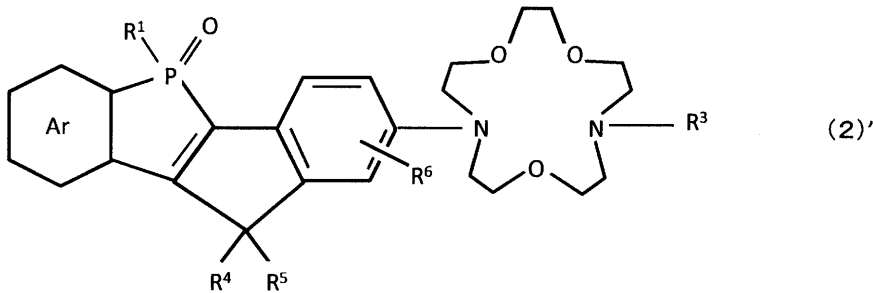
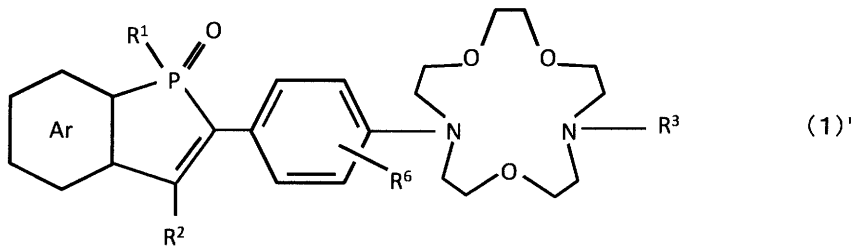
【0048】

はインデン環の5位又は6位に結合していることが好ましい。これらの場合、 R^4 及び R^5 は、アルキル基又は置換アルキル基であり、ベンゼン環である 1 に結合してアルキレン鎖又は置換アルキレン鎖を形成していてもよい。特に、本発明のホスホール化合物は、下記式(1')又は(2')で表されるものが好ましい。式(1')及び(2')において、 R^6 は、水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、パーフルオロアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アルコキシ基、カルボニル基、シアノ基、又はニトロ基である。

40

【0049】

【化 1 2】



【 0 0 5 0】

本発明のホスホール化合物は、ベンゾホスホールP - オキシド蛍光色素分子に基づくNa⁺のレシオメトリック蛍光プローブとして使用することができる。このプローブは、可視光 ($\lambda_{ex} = 405 \text{ nm}$) を用いて励起させることができ、Na⁺と錯体形成することで発光スペクトルに短波長側へのシフト (浅色シフト) を示すものである。レシオメトリック分析は、細胞間Na⁺濃度の変化をモニターするのに適するNa⁺解離定数 ($K_d = 16.0 \pm 1.2 \text{ mM}$) を示し、このプローブを用いることにより、生きている哺乳動物細胞においてNa⁺/K⁺ポンプをブロックすることにより起きる細胞間Na⁺動力学的レシオメトリック可視化が可能となる。それゆえ、このプローブは、例えば電位に誘発されたNa⁺の流入に関連した、ニューロン細胞におけるNa⁺動力学的の観測における診断ツールとして使用されることが期待できる。

【実施例】

【 0 0 5 1】

以下に実施例を示して本発明をより具体的に説明する。

【 0 0 5 2】

1. 一般操作

¹H、¹³C { ¹H } 及び³¹P { ¹H } NMRスペクトルは、核磁気共鳴装置A - 400 spectrometer (JEOL) を用いて、重クロロホルム (CDCl₃)、重クロロメタン (CD₂Cl₂)、DMSO - d₆ 又はTHF - d₈ 中で測定した (共鳴周波数¹H : 400 MHz、¹³C : 100 MHz、及び³¹P : 162 MHz)。化合物2、3、5及び7を除く化合物の¹³C { ¹H } NMRスペクトル (150 MHz) は、UltraCOOLプローブを備えた核磁気共鳴装置ECA 600 II spectrometer (JEOL) を用いて測定した。¹H NMRのケミカルシフト値は、CHCl₃ (7.26 ppm)、CH₂Cl₂ (5.30 ppm)、DMSO (2.50 ppm)、又はTHF (1.72 ppm) のシグナルを内部標準として用いて ppm で記録した。また、¹³C NMRのケミカルシフト値は、CDCl₃ (77.16 ppm)、CD₂Cl₂ (53.84 ppm)、及びDMSO - d₆ (39.52 ppm) の溶媒シグナルを内部標準として用いて記録した。³¹P NMRのケミカルシフト値は、H₃PO₄のシグナル (0.00 ppm) を外部標準として用いて記録した。質量スペクトルは、micrOTOF Focus spectrometer (Bruker) を用いて、大気圧化学イオン化 (APCI) 又はエレクトロスプレーイオン化 (ESI) のイオン化法で測定した。薄層クロマトグラフィー (TLC) は、シリカゲル60 F₂₅₄ (Merck) を0.25 mmの厚さで塗布した板を用いて行った。カラムクロマトグラ

フィーは、PSQ100B又はPSQ60B（富士シリシア化学）を用いて行った。フラッシュクロマトグラフィーは、シリカゲルカラム（ZIP Sphere cartridge）を備えたIsorera（Biotage）を用いて行った。分取りサイクルHPLCには、シリカゲルカラム（YMC-Actus SIL SL12S05-2520WX、YMC TECHNOS）又は逆相シリカゲルカラム（YMC-DispoPack AT ODS、YMC TECHNOS）を備えたLC-Forte/R（YMC TECHNOS）を用いて行った。分取りサイクル型ゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）は、ポリスチレンゲルカラム（JAIGEL 1H及び2H、日本分析化学工業）を備えたLC-918（日本分析化学工業）を使用し、溶離液としてクロロホルムを用いて行った。

10

【0053】

アセトニトリルは、使用の前には3モレキュラーシーブ上で保存した。塩化ジグリコリルは、使用する前に蒸留した。無水DMF、無水THF、及び無水トルエンは、関東化学から購入した溶媒を、有機溶媒精製装置（Glass Contour社製）を用いてさらに精製したものをを用いた。tert-ブチル2-メトキシフェニルカルバメートは、公知文献（例えば、I. Nakamura, U. Yamaguchi, D. Song, S. Konta, Y. Yamamoto, Angew. Chem. Int. Ed., 2007, 46, 2284-2287）に記載の方法に従って調製した。tert-ブチル（2,4-ジメトキシフェニル）カルバメートは、公知文献（例えば、T. Hashimoto, H. Nakatsu, Y. Takiguchi, K. Maruoka, J. Am. Chem. Soc., 2013, 135, 16010-16013）に記載の方法に従って調製した。3-プロモ-1-フェニル-2-トリメチルシリルベンゾ[b]ホスホール-P-オキシドは、公知文献（例えば、A. Fukazawa, Y. Ichihashi, Y. Kosaka, S. Yamaguchi, Chem. Asian. J., 2009, 4, 1729-1740）に記載の方法に従って調製した。他のすべての化学製品は、民間の供給業者から購入し、さらに精製することなく使用した。すべての実験は、特に記述のない限り、アルゴン雰囲気下で行った。

20

【0054】

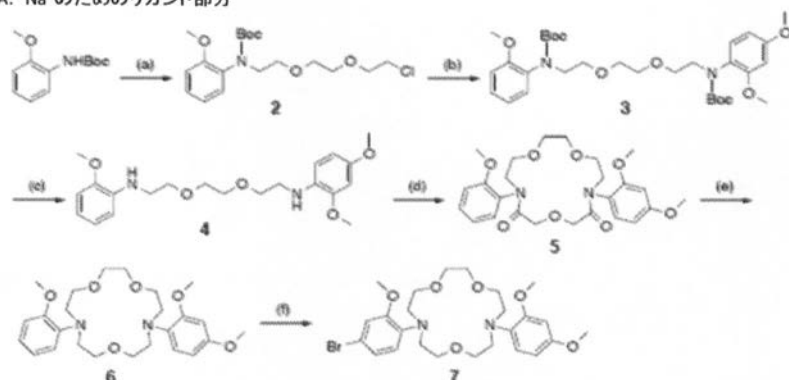
2. 合成

本発明のホスホール化合物の具体例である、NaGY-Et、NaGY、及びNaGY-AM（NaGYのアセトキシメチルエステル）を、以下のスキームに従って合成した。

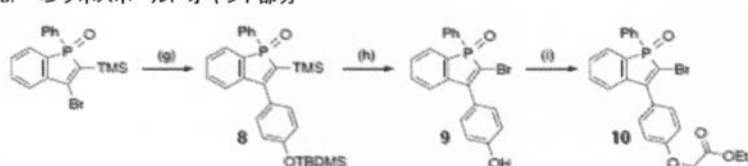
【0055】

30

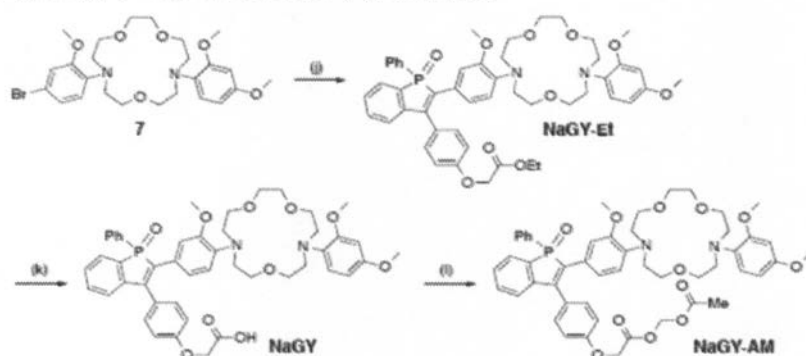
【化 1 3】

A. Na⁺のためのリガンド部分

B. ベンゾホスホールP-オキシド部分



C. 鈴木-宮浦 クロスカップリング及びカルボキシル基の改変



10

20

【 0 0 5 6】

(a) *tert*-ブチル(8-クロロ-3,6-ジオキサオクチル)(2-メトキシフェニル)カルバメート(化合物2)の合成

無水DMF(50 mL)中の1,2-ビス(2-クロロエトキシ)エタン(1.38 mL、8.80 mmol)及びNaH(鉱油中55%、212 mg、4.84 mmol)の懸濁液に、無水DMF(1.0 mL)中の*tert*-ブチル2-メトキシフェニルカルバメート(439 mg、2.20 mmol)を5分間かけて滴下した。周囲温度で2日間攪拌した後、混合物を0 で水でクエンチした。得られた有機層を分離し、水層をCHCl₃で3回抽出した。有機層を合わせて塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過して、減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(PSQ 100B、ヘキサン/酢酸エチル 3:1、R_f = 0.33)に付すことにより、化合物2を無色油状物として636 mg(1.71 mmol、収率77%)得た。

40

【 0 0 5 7】

【数 1】

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, VT 80 °C): δ 7.23 (t, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.15 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.02 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 6.90 (t, 1H, $J = 7.8$ Hz), 3.80-3.74 (m, 3H), 3.66-3.42 (m, 12H), 1.31 (br, 9H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, VT 80 °C): δ 154.7, 153.9, 130.8, 129.1, 127.6, 119.8, 111.8, 78.4, 70.3, 69.4, 69.2, 67.8, 55.2, 48.1, 42.9, 27.6. HRMS (ESI): m/z calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{O}_5\text{NCl}$: 374.1734 ($[\text{M}+\text{H}]^+$); found. 374.1750.

【0058】

10

(b) N, N' - ジ (tert - ブトキシカルボニル) - N - (2, 4 - ジメトキシフェニル) - N' - (2 - メトキシフェニル) - 4, 7 - ジオキサ - 1, 10 - ジアザデカン (化合物 3) の合成

無水 DMF (20 mL) 中の化合物 2 (15.1 g, 38.9 mmol)、NaH (鉱油中 55%、3.01 g, 69.0 mmol) 及び KI (1.50 g, 9.05 mmol) の懸濁液に、tert - ブチル (2, 4 - ジメトキシフェニル) カルバメート (12.8 g, 50.4 mmol) を 20 分間かけて滴下した。周囲温度で 1 日間攪拌した後、混合物を水でクエンチした。得られた有機層を分離し、水層を CHCl_3 で 3 回抽出した。有機層を合わせて塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過して、減圧下で濃縮した。粗混合物をシリカゲルのプラグ (PSQ 100 B、ヘキサン / 酢酸エチル 2 : 1) で濾過し、揮発性物質を減圧下で除去した。得られた粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー (PSQ 60 B、ヘキサン / 酢酸エチル 3 : 1、 $R_f = 0.14$) に付すことにより、化合物 3 を無色油状物として 15.5 g (26.2 mmol、収率 68%) 得た。

20

【0059】

【数 2】

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, VT 70 °C): δ 7.22 (td, 1H, $J = 7.8, 1.6$ Hz), 7.12 (dd, 1H, $J = 7.8, 1.6$ Hz), 7.01 (m, 2H), 6.87 (td, 1H, $J = 7.8, 1.6$ Hz), 6.56 (d, 1H, $J = 2.8$ Hz), 6.43 (dd, 1H, $J = 7.2, 2.8$ Hz), 3.87-3.74 (m, 9H), 3.46-3.36 (m, 8H), 3.11 (s, 4H), 1.30 (br, 18H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, VT 70 °C): δ 158.9, 155.5, 154.7, 153.9, 130.7, 129.4, 129.2, 127.7, 123.8, 119.8, 111.8, 104.3, 98.9, 78.4, 78.2, 69.2, 67.7, 55.3, 55.24, 55.15, 55.06, 54.98, 48.1, 27.6 (1つのカルボニルのピーク及び2つの脂肪族のピークが重なっている)。HRMS (APCI): m/z calcd. for $\text{C}_{31}\text{H}_{47}\text{O}_9\text{N}_2$: 591.3282 ($[\text{M}+\text{H}]^+$); found. 591.3273.

30

【0060】

(c) 1 - (2 - メトキシフェニル) - 10 - (2, 4 - ジメトキシフェニル) - 4, 7 - ジオキサ - 1, 10 - ジアザデカン (化合物 4) の合成

40

CH_2Cl_2 (85 mL) 中の化合物 3 (9.78 g, 16.5 mmol) の懸濁液に、トリフルオロ酢酸 (15.0 mL) を大気下で添加した。周囲温度で 1.5 時間攪拌した後、揮発性物質を減圧下で除去した。得られた油状物を NaHCO_3 水溶液で中和した。有機層を分離し、水層を CH_2Cl_2 で 5 回抽出した。有機層を合わせて水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過して、減圧下で濃縮した。粗混合物をフラッシュクロマトグラフィー (ZIP Sphere 45 g、ヘキサン / 酢酸エチル 1 : 3、 $R_f = 0.32$) に付すことにより、化合物 4 を無色油状物として 5.67 g (14.5 mmol、収率 88%) 得た。

【0061】

【数3】

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 6.86 (td, 1H, $J = 7.8, 1.4$ Hz), 6.76 (dd, 1H, $J = 7.8, 1.4$ Hz), 6.68 (td, 1H, $J = 7.8, 1.4$ Hz), 6.62 (dd, 1H, $J = 7.8, 1.4$ Hz), 6.54 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz), 6.45 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 6.40 (dd, 1H, $J = 8.6, 2.4$ Hz), 4.38 (br, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.77-3.72 (m, 7H), 3.67 (s, 4H), 3.33 (t, 2H, $J = 5.4$ Hz), 3.28 (t, 2H, $J = 5.4$ Hz). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (150 MHz, CDCl_3): δ 152.2, 148.5, 147.2, 138.3, 132.6, 121.3, 116.8, 110.6, 110.1, 109.6, 103.8, 99.3, 70.5, 70.1, 70.0, 55.9, 55.6, 55.5, 44.2, 43.4 (1つの脂肪族のピークが重なっている). HRMS (APCI): m/z calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{O}_5\text{N}_2$: 391.2233 ($[\text{M}+\text{H}]^+$); found. 391.2244.

10

【0062】

(d) 7 - (2 - メトキシフェニル) - 13 - (2, 4 - ジメトキシフェニル) - 1, 4, 7 - トリオキサ - 7, 13 - ジアザシクロペンタデカン - 8, 12 - ジオン (化合物5) の合成

無水トルエン (1 L) を入れたフラスコに、無水ピリジン (20 mL) 及び無水トルエン (80 mL) の混合物中の化合物4 (4.67 g, 12.0 mmol) の溶液、及び無水トルエン (100 mL) 中の塩化ジグリコリル (2.08 g, 12.0 mmol) の溶液を、100 で24時間かけて同時に滴下した。溶液をさらに100 で2日間攪拌し、その後すべての揮発性物質を減圧下で除去した。水及び CH_2Cl_2 を添加した後、有機層を分離し、水層を CH_2Cl_2 で3回抽出した。有機層を合わせて水で2回洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下で濃縮した。粗混合物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (PSQ 100B、クロロホルム/メタノール 19:1、 $R_f = 0.34$) に付し、その後GPCに付すことにより、化合物5を無色固体として2.04 g (4.18 mmol、収率35%) 得た。

20

【0063】

【数4】

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, VT 150 °C): δ 7.40-7.21 (m, 3H), 7.10 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz), 7.01 (t, 1H, $J = 7.6$ Hz), 6.65 (s, 1H), 6.58 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), 4.08 (br, 3H), 3.85-3.77 (m, 10H), 3.62 (br, 6H), 3.52 (br, 6H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, VT 150 °C): δ 168.3, 168.1, 159.6, 155.6, 154.7, 130.5, 130.1, 128.3, 120.0, 119.9, 112.4, 112.3, 105.1, 99.5, 69.3, 69.2, 66.7, 66.6, 66.1, 55.32, 55.26, 54.92, 54.88, 46.7 (1つの脂肪族のピークが重なっている). HRMS (APCI): m/z calcd. for $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{O}_8\text{N}_2$: 489.2237 ($[\text{M}+\text{H}]^+$); found. 489.2218.

30

【0064】

(e) 7 - (2 - メトキシフェニル) - 13 - (2, 4 - ジメトキシフェニル) - 1, 4, 10 - トリオキサ - 7, 13 - ジアザシクロペンタデカン (化合物6) の合成

無水THF (18 mL) 中の化合物5 (870 mg, 1.78 mmol) 及び NaBH_4 (503 mg, 13 mmol) の懸濁液に、 $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (8.4 mL, 67 mmol) を室温で注意深く添加した。4時間還流しながら攪拌した後、混合物を K_2CO_3 水溶液で中和し、水層を CHCl_3 で3回抽出した。有機層を合わせて無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過して、減圧下で濃縮した。粗混合物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (PSQ 100B、ヘキサン/酢酸エチル/トリエチルアミン 5:5:1、 $R_f = 0.49$) に付すことにより、化合物6を無色油状物として770 mg (1.67 mmol、収率94%) 得た。

40

【0065】

【数5】

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.05 (dd, 1H, *J* = 7.6, 1.6 Hz), 7.03 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 6.94 (td, 1H, *J* = 7.6, 1.6 Hz), 6.88 (td, 1H, *J* = 7.6, 1.6 Hz), 6.84 (dd, 1H, *J* = 7.6, 1.6 Hz), 6.45 (d, 1H, *J* = 2.8 Hz), 6.39 (dd, 1H, *J* = 8.4, 2.8 Hz), 3.82 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 3.72 (t, 2H, *J* = 5.4 Hz), 3.68-3.61 (m, 8H), 3.58 (t, 2H, *J* = 6.0 Hz), 3.47 (m, 4H), 3.38 (t, 2H, *J* = 5.6 Hz), 3.34 (t, 2H, *J* = 5.4 Hz); ¹³C{¹H} NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 156.5, 155.2, 153.0, 140.6, 133.9, 124.0, 122.3, 121.0, 120.9, 111.9, 103.5, 100.2, 71.22, 71.17, 70.9, 70.0, 69.9, 55.65, 55.57, 55.53, 53.9, 53.35, 53.27, 52.7 (1つの脂肪族のピークが重なっている). HRMS (APCI): *m/z* calcd. for C₂₅H₃₇O₆N₂: 461.2652 ([*M*+H]⁺); found. 461.2666.

10

【0066】

(f) 7 - (4 - ブロモ - 2 - メトキシフェニル) - 13 - (2, 4 - ジメトキシフェニル) - 1, 4, 10 - トリオキサ - 7, 13 - ジアザシクロペンタデカン (化合物7) の合成

無水CH₃CN (10 mL) 中の化合物6 (800 mg、1.74 mmol) の溶液に、無水CH₃CN (10 mL) 中のN - プロモスクシンイミド (325 mg、1.8 mmol) を -30 で10分間かけて滴下した。室温で16時間攪拌した後、混合物をK₂CO₃水溶液でクエンチした。すべての揮発性物質を減圧下で除去し、得られた混合物をCHCl₃で5回抽出した。有機層を合わせて水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過して、減圧下で濃縮した。粗混合物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (PSQ 100B、ヘキサン/酢酸エチル/トリエチルアミン 5 : 5 : 1、R_f = 0.49) に付すことにより、化合物7を無色油状物として784 mg (1.45 mmol、収率85%) 得た。

20

【0067】

【数6】

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.02-6.98 (m, 2H), 6.92-6.90 (m, 2H), 6.45 (d, 1H, *J* = 2.8 Hz), 6.39 (dd, 1H, *J* = 8.8, 2.8 Hz), 3.81 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 3.69 (t, 2H, *J* = 5.8 Hz), 3.67-3.58 (m, 8H), 3.56 (t, 2H, *J* = 6.0 Hz), 3.46-3.40 (m, 4H), 3.36 (t, 2H, *J* = 6.0 Hz), 3.32 (t, 2H, *J* = 5.0 Hz). ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 156.6, 155.3, 153.6, 139.7, 133.8, 124.2, 123.7, 122.1, 115.2, 114.2, 103.4, 100.1, 71.1, 71.0, 70.9, 69.9, 69.7, 55.8, 55.6, 55.5, 53.9, 53.3, 53.2, 52.7 (1つの脂肪族のピークが重なっている). HRMS (APCI): *m/z* calcd. For C₂₅H₃₆O₆N₂Br: 539.1757 ([*M*+H]⁺); found. 539.1738.

30

【0068】

(g) 2 - トリメチルシリル - 3 - (4 - tert - ブチルジメチルシロキシフェニル) - 1 - フェニルベンゾ [b] ホスホール - P - オキシド (化合物8) の合成

脱気したトルエン (32 mL) 及び脱気したH₂O (8 mL) の混合物中の3 - ブロモ - 1 - フェニル - 2 - トリメチルシリルベンゾ [b] ホスホール - P - オキシド (1.48 g、3.94 mmol)、4 - (tert - ブチルジメチルシロキシ) フェニルボロン酸 (1.30 g、5.16 mmol)、Pd (PPh₃)₄ (89 mg、77 μmol)、及びK₃PO₄ (3.77 g、17.8 mmol) の溶液を90 で12時間攪拌した。次いで、有機層を分離し、水層を酢酸エチルで3回抽出した。有機層を合わせて水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過して、減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (PSQ 100B、CHCl₃/酢酸エチル 5 : 1) によ

40

50

り、その後GPCにより精製することにより、化合物8を無色油状物として1.78g (3.43 mmol、収率85%) 得た。

【0069】

【数7】

¹H NMR (400 MHz, THF-*d*₆): δ 7.67 (dd, 2H, *J* = 11.6, 8.4 Hz), 7.50-7.38 (m, 2H), 7.38-7.32 (m, 3H), 7.32-7.15 (m, 3H), 7.00-6.91 (m, 3H), 0.99 (s, 9H), 0.22 (s, 6H), -0.20 (s, 9H). ¹³C{¹H} NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 165.3 (d, *J*_{CP} = 10.5 Hz, C), 156.3 (s, C), 145.4 (d, *J*_{CP} = 34.5 Hz, C), 135.7 (d, *J*_{CP} = 57.5 Hz, C), 135.4 (d, *J*_{CP} = 99.2 Hz, C), 132.6 (s, CH), 131.9 (s, CH), 131.2 (d, *J*_{CP} = 10.5 Hz, CH), 131.1 (d, *J*_{CP} = 94.8 Hz, C), 129.9 (d, *J*_{CP} = 20.1 Hz, C), 129.7 (br, CH), 129.4 (d, *J*_{CP} = 10.5 Hz, CH), 128.9 (d, *J*_{CP} = 12.9 Hz, CH), 128.6 (d, *J*_{CP} = 10.5 Hz, CH), 123.9 (d, *J*_{CP} = 12.9 Hz, C), 120.4 (s, CH), 25.9 (s, CH₃), 18.5 (s, C), 0.2 (s, CH₃), -4.2 (s, CH₃). ³¹P{¹H} NMR (162 MHz, CDCl₃): δ 44.8. HRMS (APCI): *m/z* calcd. for C₂₉H₃₈O₂Si₂P: 505.2142 ([M+H]⁺); found. 505.2153.

10

【0070】

(h) 2-プロモ-3-(4-ヒドロキシフェニル)-1-フェニルベンゾ[b]ホスホール-P-オキシド(化合物9)の合成

20

CH₃CN (15 mL) 中のN-プロモスクシンイミド(854 mg、4.80 mmol) 及び化合物8(1.69 g、3.35 mmol)の溶液を、大気下で15時間還流しながら攪拌した。Na₂SO₃水溶液を添加し、次いで、すべての揮発性物質を減圧下で除去した。得られた混合物をCHCl₃で4回抽出した。有機層を合わせて塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過して、減圧下で濃縮した。次いで、THF(15 mL)中のテトラ(n-ブチル)アンモニウムフルオリド(952 mg、3.64 mmol)を添加し、混合物を大気下、周囲温度で1.5時間攪拌した。溶媒を減圧下で除去した後、水を添加して混合物をCHCl₃で4回抽出した。有機層を合わせて塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過して、減圧下で濃縮した。粗混合物をフラッシュカラムクロマトグラフィー(ZIP Sphere 30 g、CHCl₃/酢酸エチル 4:1、R_f = 0.28)に付すことにより、化合物9を無色固体として917 mg (2.31 mmol、収率70%) 得た。

30

【0071】

【数8】

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.97 (s, 1H), 7.76-7.63 (m, 4H), 7.62-7.53 (m, 3H), 7.48 (td, 1H, *J* = 7.2, 3.2 Hz), 7.39 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.28 (dd, 1H, *J* = 7.2, 3.2 Hz), 6.97 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz). ¹³C{¹H} NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆): δ 158.2 (s, C), 152.2 (d, *J*_{CP} = 22.9 Hz, C), 142.0 (d, *J*_{CP} = 22.9 Hz, C), 132.9 (s, CH), 132.3 (s, CH), 131.0 (d, *J*_{CP} = 104.9 Hz, C), 130.4 (d, *J*_{CP} = 11.5 Hz, CH), 129.5 (s, CH), 128.8 (d, *J*_{CP} = 11.6 Hz, CH), 128.74 (d, *J*_{CP} = 12.9 Hz, CH), 128.66 (d, *J*_{CP} = 12.9 Hz, CH), 128.0 (d, *J*_{CP} = 104.9 Hz, C), 123.3 (d, *J*_{CP} = 10.1 Hz, CH), 122.1 (d, *J*_{CP} = 11.4 Hz, C), 116.7 (d, *J*_{CP} = 104.1 Hz, C), 115.3 (s, CH). ³¹P{¹H} NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆): δ 31.2. HRMS (APCI): *m/z* calcd. for C₂₀H₁₅O₂BrP: 396.9993 ([M+H]⁺); found. 396.9990.

40

【0072】

(i) 2-プロモ-3-(4-エトキシカルボニルメチルオキシフェニル)-1-フェニルベンゾ[b]ホスホール-P-オキシド(化合物10)の合成

50

DMF (15 mL) 中のプロモ酢酸エチル (300 μ L、2.71 mmol)、化合物 9 (916 mg、2.31 mmol)、及び K_2CO_3 (749 mg、5.42 mmol) の懸濁液を、大気下、50 で16時間攪拌した。水を添加した後、水層を $CHCl_3$ で抽出した。有機層を合わせて塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過して、減圧下で濃縮した。粗混合物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (PSQ 100 B、 $CHCl_3$ / 酢酸エチル 9 : 1、 $R_f = 0.32$) に付し、その後GPCに付すことにより、化合物 10 を無色油状物として 988 mg (1.96 mmol、収率 85%) 得た。

【0073】

【数9】

10

1H NMR (400 MHz, THF- d_6): δ 7.72 (ddd, 2H, $J = 12.8, 8.3, 1.2$ Hz), 7.63 (dd, 1H, $J = 9.2, 7.6$ Hz), 7.57-7.51 (m, 1H), 7.51-7.42 (m, 5H), 7.42-7.35 (m, 1H), 7.26 (dd, 1H, $J = 7.6, 3.2$ Hz), 7.09 (d, 2H, $J = 9.2$ Hz), 4.74 (s, 2H), 4.21 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz), 1.26 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz). $^{13}C\{^1H\}$ NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 168.8 (s, C), 158.8 (s, C), 152.4 (d, $J_{CP} = 23.1$ Hz, C), 143.3 (d, $J_{CP} = 23.0$ Hz, C), 133.4 (d, $J_{CP} = 1.7$ Hz, CH), 133.1 (d, $J_{CP} = 2.5$ Hz, CH), 131.5 (d, $J_{CP} = 11.6$ Hz, CH), 131.3 (d, $J_{CP} = 104.9$ Hz, C), 130.4 (s, CH), 130.0 (d, $J_{CP} = 8.6$ Hz, CH), 129.3 (d, $J_{CP} = 11.6$ Hz, CH), 129.2 (d, $J_{CP} = 13.2$ Hz, CH), 128.7 (d, $J_{CP} = 107.7$ Hz, C), 125.8 (d, $J_{CP} = 17.5$ Hz, C), 124.0 (d, $J_{CP} = 10.1$ Hz, CH), 118.3 (d, $J_{CP} = 104.9$ Hz, C), 115.1 (s, CH), 65.5 (s, CH_2), 61.7 (s, CH_2), 14.4 (s, CH_3). $^{31}P\{^1H\}$ NMR (162 MHz, $CDCl_3$): δ 30.1. HRMS (APCI): m/z calcd. for $C_{24}H_{21}O_4BrP$: 483.0361 ($[M+H]^+$); found. 483.0349.

20

【0074】

(j) NaGY - Et の合成

1, 4 - ジオキサン (5.0 mL) 中の化合物 7 (539 mg、1.00 mmol)、ビス (ピナコラト) ジボラン (263 mg、1.00 mmol)、Pd (dppf) Cl_2 (73.4 mg、0.10 mmol)、及び KOAc (206 mg、2.12 mmol) の懸濁液を、100 で24時間加熱した。化合物 7 が完全に消失した後、脱気した 1, 4 - ジオキサン (3.0 mL) 及び水 (1.0 mL) 中の化合物 10 (520 mg、1.1 mmol) 及び K_3PO_4 (1.12 g、5.35 mmol) の混合物を添加した。100 で17時間攪拌した後、すべての揮発性物質を減圧下で除去した。水及び $CHCl_3$ を添加した後、有機層を分離し、水層を $CHCl_3$ で5回抽出した。有機層を合わせて水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過して、減圧下で濃縮した。粗混合物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (PSQ 100 B、溶離剤をヘキサン / $CHCl_3$ / Et_3N 4 : 6 : 1 から $CHCl_3$ / MeOH / Et_3N 9 : 1 : 1 へ徐々に変化させた) に付した。粗生成物をさらにGPC及びHPLC (ヘキサン / $CHCl_3$ / Et_3N 4 : 6 : 1) により精製することにより、NaGY - Et を黄色固体として 103 mg (0.12 mmol、収率 12%) 得た。

30

40

【0075】

【数 1 0】

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.80 (dd, 2H, $J = 12.4, 8.0$ Hz), 7.64 (dd, 1H, $J = 9.2, 7.6$ Hz), 7.53-7.38 (m, 4H), 7.35-7.28 (m, 3H), 7.13 (dd, 1H, $J = 8.4, 1.6$ Hz), 7.01 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz), 6.98 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz), 6.86 (dd, 1H, $J = 8.4, 1.6$ Hz), 6.65 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), 6.62 (s, 1H), 6.44 (d, 1H, 2.4 Hz), 6.37 (dd, 1H, $J = 8.8, 2.4$ Hz), 4.67 (s, 2H), 4.29 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz), 3.78 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.65 (t, 2H, $J = 5.2$ Hz), 3.62-3.56 (m, 8H), 3.52 (t, 2H, $J = 6.0$ Hz), 3.46-3.35 (m, 7H), 3.33 (t, 2H, $J = 6.0$ Hz), 3.28 (t, 2H, $J = 5.2$ Hz), 1.32 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (150 MHz, CDCl_3): δ 168.8 (s, C), 158.1 (s, C), 156.5 (s, C), 155.2 (s, C), 151.2 (s, C), 146.9 (d, $J_{\text{CP}} = 22.9$ Hz, C), 144.6 (d, $J_{\text{CP}} = 27.3$ Hz, C), 140.5 (s, C), 133.9 (s, C), 133.8 (d, $J_{\text{CP}} = 96.3$ Hz, C), 133.0 (s, CH), 132.2 (d, $J_{\text{CP}} = 2.8$ Hz, CH), 132.0 (d, $J_{\text{CP}} = 106.3$ Hz, C), 131.1 (d, $J_{\text{CP}} = 10.1$ Hz, CH), 131.0 (d, $J_{\text{CP}} = 99.1$ Hz, C), 130.7 (s, CH), 129.0 (d, $J_{\text{CP}} = 11.5$ Hz, CH), 128.7 (d, $J_{\text{CP}} = 10.1$ Hz, CH), 128.5 (d, $J_{\text{CP}} = 15.7$ Hz, C), 125.4 (d, $J_{\text{CP}} = 10.1$ Hz, C), 123.9 (s, CH), 123.6 (d, $J_{\text{CP}} = 11.4$ Hz, CH), 122.4 (d, $J_{\text{CP}} = 5.7$ Hz, CH), 118.6 (s, CH), 115.5 (s, CH), 112.6 (d, $J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, CH), 103.5 (s, CH), 100.1 (s, CH), 71.2 (s, CH_2), 70.9 (s, CH_2), 70.9 (s, CH_2), 69.8 (s, CH_2), 65.5 (s, CH_2), 61.7 (s, CH_2), 55.6 (s, CH_3), 55.5 (s, CH_3), 55.0 (s, CH_3), 53.9 (s, CH_2), 53.2 (s, CH_2), 53.0 (s, CH_2), 52.5 (s, CH_2), 14.4 (s, CH_3) (1つの芳香族のピーク及び2つの脂肪族のピークが重なっている). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz, CDCl_3): δ 40.6. HRMS (APCI): m/z calcd. for $\text{C}_{49}\text{H}_{56}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{P}$: 863.3667 ($[\text{M}+\text{H}]^+$); found. 863.3629.

10

20

【0 0 7 6】

(k) NaGYの合成

MeOH (1.0 mL) 及び水 (0.5 mL) 中の NaGY-Et (13 mg、 $15 \mu\text{mol}$) 及び $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1.3 mg、 $30 \mu\text{mol}$) の溶液を、大気下、周囲温度で90分間攪拌した。次いですべての揮発性物質を減圧下で除去した。水及び CHCl_3 を添加した後、有機層を分離し、水層を CHCl_3 で3回抽出した。有機層を合わせて塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過して、減圧下で濃縮した。粗混合物を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー及び逆相HPLC (溶離剤を、0.1% TFAを含む $\text{H}_2\text{O} / \text{CH}_3\text{CN}$ 4:1 から 0.1% TFAを含む $\text{H}_2\text{O} / \text{CH}_3\text{CN}$ 1:1 へ徐々に変化させた) に付した。得られた生成物を凍結乾燥することにより、NaGYを黄色固体として10 mg (1.2mmol 、収率83%) 得た。

30

【0 0 7 7】

【数 1 1】

^1H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2): δ 7.97-7.21 (m, 12H), 7.16-6.89 (br, 4H), 7.85-6.56 (m, 2H), 6.43 (br, 1H), 4.69 (s, 2H), 4.13-2.92 (m, 29H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (150 MHz, CDCl_3): δ 170.7 (s, C), 162.2 (s, C), 158.8 (s, C), 153.1 (s, C), 152.0 (s, C), 150.2 (d, $J_{\text{CP}} = 17.3$ Hz, C), 143.9 (d, $J_{\text{CP}} = 25.8$ Hz, C), 133.4 (s, CH), 133.9 (d, $J_{\text{CP}} = 96.5$ Hz, C), 132.6 (s, CH), 131.8 (d, $J_{\text{CP}} = 106.3$ Hz, C), 131.1 (d, $J_{\text{CP}} = 10.1$ Hz, CH), 130.5 (s, CH), 130.0 (d, $J_{\text{CP}} = 99.1$ Hz, C), 129.5 (d, $J_{\text{CP}} = 10.1$ Hz, CH), 129.2 (d, $J_{\text{CP}} = 11.4$ Hz, CH), 127.0 (d, $J_{\text{CP}} = 14.3$ Hz, CH), 125.4 (s, CH), 124.3 (d, $J_{\text{CP}} = 11.5$ Hz, CH), 122.5 (s, CH), 121.3 (s, CH), 118.7 (s, C), 117.7 (s, C), 115.8 (s, C), 115.5 (s, CH), 113.2 (d, $J_{\text{CP}} = 5.7$ Hz, CH), 106.3 (s, CH), 100.1 (s, CH), 70.2 (s, CH_2), 70.1 (s, CH_2), 68.8 (s, CH_2), 68.2 (s, CH_2), 65.3 (s, CH_2), 64.4 (s, CH_2), 64.3 (s, CH_2), 57.4 (s, CH_2), 57.3 (s, CH_2), 56.6 (s, CH_3), 56.0 (s, CH_3), 55.7 (s, CH_3), 55.2 (s, CH_2), 53.4 (s, CH_2) (1つの脂肪酸のピークが重なっている). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz, CD_2Cl_2): δ 40.7. HRMS (APCI): m/z calcd. for $\text{C}_{47}\text{H}_{52}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{P}$: 835.3354 ($[\text{M}+\text{H}]^+$); found. 835.3360.

10

【0078】

20

(1) NaGY - AMの合成

CH_2Cl_2 (2.5 mL) 中の NaGY (49.8 mg, 0.06 mmol)、酢酸プロモメチル (70 μL , 0.71 mmol)、及びエチルジ(イソプロピル)アミン (30 μL , 0.18 mmol) の溶液を、室温で18時間攪拌した。すべての揮発性物質を減圧下で除去した後、混合物をヘキサンで3回洗浄し、逆相 HPLC (溶離剤を、5 mMギ酸アンモニウムを含む $\text{H}_2\text{O} / \text{CH}_3\text{CN}$ 1:1 から 5 mMギ酸アンモニウムを含む CH_3CN へ徐々に変化させた) により精製した。得られた生成物を凍結乾燥することにより、NaGY - AMを黄色固体として 5.1 mg (収率 9%) 得た。しかしながら、量が足りず、 ^{13}C NMR スペクトルを測定できなかった。

【0079】

30

【数 1 2】

^1H NMR (400 MHz, acetone- d_6) δ 7.84 (d, 2H, $J = 7.2$ Hz, 12.0 Hz), 7.66-7.36 (m, 9H), 7.20-7.13 (m, 3H), 7.10-6.93 (m, 1H), 6.74 (br, 2H), 6.56-6.35 (m, 2H), 5.84 (s, 2H), 4.92 (s, 2H), 3.77 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 3.68-3.49 (m, 10H), 3.48-3.30 (m, 9H), 3.24 (t, 2H, $J = 6.0$ Hz), 3.18 (t, 2H, $J = 4.8$ Hz), 2.07 (s, 3H). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz, CD_2Cl_2): δ 40.6. HRMS (ESI): m/z calcd. for $\text{C}_{50}\text{H}_{56}\text{N}_2\text{O}_{12}\text{P}$: 907.3571 ($[\text{M}+\text{H}]^+$); found. 907.3587.

【0080】

40

3. 光物理的測定

NaGYのすべての分光計測を、1% DMSOを含む 50 mM HEPESバッファー (pH 7.4) 中で行った。NaGYの紫外可視吸収スペクトルの計測は、分光光度計 UV-3150 (島津製作所) を使用し、1 cm角の石英キュベットを用いて、0.2 nmの分解能で行った。発光スペクトル (25 μM NaGY) は、分光蛍光光度計 F-4500 (日立) を使用し、10 nmのスリット幅で測定した。光電子増倍管の電圧は700 Vであった。絶対蛍光量子収率は、校正積分球システム PMA-11 (浜松ホトニクス) で決定した。

【0081】

(1) Na^+ の添加の前後で NaGY の吸収スペクトル及び発光スペクトルを測定した。

50

NaGYの分光計測を、共溶媒として1% DMSOを含む50 mM HEPES (pH 7.4) 中で行った。添加するNa⁺濃度は200 mMであった。発光スペクトルは励起波長405 nmで測定した。その結果を図1に示す。図1において、破線は吸収スペクトルを示し、実線は発光スペクトルを示す。

【0082】

図1より、NaGYでは、394 nmの最大値を中心とした幅広い吸収バンド ($\epsilon = 5.63 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) が観測された。Na⁺の濃度が増加すると、吸収最大値は浅色的に371 nmまでシフトした。その一方で、モル吸収係数は維持された。滴定の間に、2つの異なる等吸収点が337 nm及び374 nmで観測され、これは溶液中でのNaGYのNa⁺フリー形態とNa⁺結合形態との間の信号平衡を示している。吸収スペクトル中の浅色シフトは、Na⁺イオンがドナー窒素原子へ配位したためであり、これがNaGYの分子内電荷移動 (ICT) 特性を減少させたと考えられる。

10

【0083】

(2) 種々のNa⁺濃度の存在下でNaGYの発光スペクトルを測定した。具体的には、NaCl (0、5、20、30、40、65、100、又は200 mM) を添加して、50 mM HEPES (pH 7.4) 中でNaGY (25 μM) の発光スペクトルを測定した。すべてのスペクトルは、405 nmの励起波長で記録した。その結果を図2(a)に示す。

【0084】

図2(a)より、Na⁺の不在下では、NaGYは赤領域に幅広い発光バンドを示し ($\lambda_{em} = 656 \text{ nm}$; 図2(a)中の(i))、非常に大きいStokesシフト (10100 cm^{-1}) が同時に起こった。このStokesシフトは、おそらく励起状態におけるより明白なICT特性に起因する。これは、水性媒体中でのNaGYの低い蛍光量子収率 ($\phi_F = 0.016$) の部分的な要因であろう。Na⁺の濃度が増加するにつれて、発光スペクトルは浅色シフトを示し、200 mMのNa⁺濃度で最大発光波長が620 nmに達した(図2(a)中の(ii))。その一方で、量子収率 ($\phi_F = 0.028$) はNa⁺フリーのNaGYのそれに匹敵した。

20

【0085】

Na⁺の結合が、405 nmでの励起で575 nm及び700 nmで蛍光強度に最も大きい変化をもたらすことがわかったので(図示せず)、Na⁺の濃度に対する575 nmと700 nmとの間の蛍光強度比 (I_{575} / I_{700}) をプロットした。その結果を図2(b)に示す。この結果から、以下のようにして解離定数を算出したところ、 $K_d = 16.0 \pm 1.2 \text{ mM}$ であった。これは吸収滴定から得られた値と良く一致している。この非線形適合解析により、NaGYは5~60 mMのNa⁺濃度の検出に適しており、これは細胞間Na⁺濃度変動をモニターするのに最適な範囲であることが明らかとなった。

30

【0086】

解離定数 (K_d) の決定

NaGYのNa⁺を用いた吸収分光滴定を、1% DMSOを含む50 mM HEPES バッファー (pH 7.4) 中で行った。NaGY (100 μM) の最初の吸収スペクトルを測定し、溶液に適量のNaClを直接添加した。410 nmでの吸光度 (A_{410}) を合計 [Na⁺] に対してプロットし、実験データを以下の方程式 (eq. 1) :

40

【0087】

【数13】

$$A_{410} = \frac{A_0 K_d + A_\infty [\text{Na}^+]}{K_d + [\text{Na}^+]} \quad (\text{eq. 1})$$

【0088】

(ここで、 A_0 は410 nmでの最初の吸光度値を表し、 A_∞ は410 nmでの最後の吸光度値を表す。) を用いて、非線形最小二乗法曲線適合法により分析した。

【0089】

50

Na^+ を用いたNaGYの蛍光でのレシオメトリック滴定は、用いたNaGYの濃度を25 μM にしたことを除き、上述の実験手順に従って行った。575 nmと700 nmとの間の蛍光強度比 (I_{575} / I_{700}) を合計 [Na^+] に対してプロットした。データを以下の方程式 (eq. 2) :

【0090】

【数14】

$$I_{575}/I_{700} = \frac{R_{\max}K_d'[\text{Na}^+] + R_{\min}}{1 + K_d'[\text{Na}^]}, \quad K_d' = K_d \left(\frac{S_{f2}}{S_{b2}} \right) \quad (\text{eq. 2})$$

10

【0091】

(ここで、 R_{\min} は最小比値を表し、 R_{\max} は最大比値を表す。 S_{f2} という表現は、700 nmでの Na^+ フリー形態の発光強度であり、 S_{b2} という表現は、700 nmでの Na^+ 結合形態の発光強度である)を用いて曲線適合法により分析した。

【0092】

(3) 生物学系におけるNaGYの性能をテストするために、種々の生物学的に関連する金属イオンの存在下で発光スペクトルを測定した。具体的には、NaGYの発光スペクトルを、150 mM Na^+ 及び K^+ 、10 mM Ca^{2+} 及び Mg^{2+} 、又は0.1 mM Mn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 及び Zn^{2+} の存在下で測定した。使用したすべての金属源は塩化物塩であった。 Na^+ 及び K^+ については、各塩化物塩をキュベット中の25 μM NaGY (2.0 mL) の溶液に直接添加した。 Ca^{2+} 及び Mg^{2+} については、50 mM HEPESバッファー (pH 7.4) 中の1 Mストック溶液を調製した。 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 及び Zn^{2+} については、50 mM HEPESバッファー (pH 7.4) 中の金属塩の10 mMストック溶液を調製した。 Fe^{3+} については、1 mM HCl水溶液 (pH ~ 3) 中の1 mMストック溶液を調製した。続いて、20 μL のストック溶液を2.0 mLの試料に添加した。指示された金属イオンを含む各溶液に、NaCl (17.53 mg、0.3 mmol) を直接添加した。試料を5分間攪拌し、発光スペクトルを測定した。575 nmと700 nmとの間の蛍光強度比 (I_{575} / I_{700}) を計算した。結果を図3に示す。なお、図3において、灰色の棒は、150 mM Na^+ 又は K^+ 、10 mM Ca^{2+} 又は Mg^{2+} 、又は0.1 mM Mn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 又は Zn^{2+} のいずれかの存在下での575 nmと700 nmとの間の蛍光強度比 (I_{575} / I_{700}) を表す。黒色の棒は、溶液に200 mM Na^+ を添加した後の測定結果を表す。

20

30

【0093】

図3より、NaGYは Na^+ に対して高い選択性を示すことがわかった。10 mM Mg^{2+} 又は Ca^{2+} を添加しても(これらの金属イオンは、mMの範囲で細胞質中に存在する) 蛍光特性における顕著な変化は観測されず、 Mn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 及び Zn^{2+} を含む0.1 mMの生物学的に微量の金属を添加した場合でも顕著な変化は観測されなかった。さらに、これらの金属イオンの存在は、 Na^+ の錯体形成を妨げなかった。

40

【0094】

(4) NaGY (25 μM) の発光スペクトルを、種々のpH値において緩衝液中で測定した。各pH緩衝液は、pH 5.5 ~ 7ではMESを、pH 7.5及び8ではHEPESを用いて調製し、pH値は、 $\text{Me}_4\text{NOH} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ を用いて調整した。結果を図4に示す。

【0095】

図4より、NaGYの発光スペクトルは広い範囲のpH値 (pH 5 - 8) で一定であり、それゆえその蛍光特性は細胞間のpH変化により影響されないことがわかった。さらに、トリパンブルー分析により、NaGYの細胞毒性が無視できる程度であることが明らかとなった (図示せず)。

50

【0096】

4. 細胞培養実験

HeLa細胞（理化学研究所 細胞材料開発室（Cell Bank）、日本）を、5% CO₂ / 95% 空気のインキュベーター中で37℃で10%ウシ胎児血清（FBS、ギブコ）及び1%抗生物質 - 抗真菌溶液（AA、シグマ）を含むダルベッコ改変イーグル培地（DMEM、シグマ）中で培養した。イメージングの前に、細胞（5 × 10⁴）を3日間、ガラス底の8ウェルプレートに播種した。細胞間Na⁺のレシオメトリックイメージングのために、インキュベーション培地を細胞から除去し、次いで細胞を37℃で30分間DMEM中で10 μM NaGY - AMをインキュベートし、DMEMで3回洗い流した。プレートを20 μLのDMEMで満たした後、GaAsPマルチチャンネルスペクトル検出器を備えた共焦点顕微鏡LSM 780（ツァイス）を用いて、405 nmレーザーで蛍光イメージを記録した。細胞間Na⁺のレシオメトリックイメージングのために、それぞれNa⁺結合形態に対応する565 - 574 nmの範囲での積分発光強度（I₅₆₅₋₅₇₄）、及びNa⁺フリー形態に対応する662 - 689 nmの範囲での積分発光強度（I₆₆₂₋₆₈₉）を、ImageJソフトウェアを用いて採取し、比イメージ（I₅₆₅₋₅₇₄及びI₆₆₂₋₆₈₉）をピクセルベースで得た。

10

【0097】

生体内でのNa⁺動力学のイメージングを以下のように行った。取得開始前に、細胞を37℃で30分間NaGY（10 μM）で染色した。インキュベーション培地を、取得開始後10分で細胞から除去し、次いでPBS（pH 7.4）中の140 mM Na⁺を含むK⁺フリーの培地を細胞に添加した。結果を図5に示す。

20

【0098】

図5（a）及び（b）は、Na⁺ / K⁺ポンプの阻害による、すなわちNa⁺ / K⁺ポンプ活性は細胞間Na⁺濃度に敏感であることから、インキュベーション培地を140 mM Na⁺を含むK⁺フリーDMEMに置き換えることによる、疑似カラー化した比のイメージの変化を示している。図5（c）から、インキュベーション期間の間に、Na⁺ / K⁺ポンプをブロックした後、I₅₆₅₋₅₇₄ / I₆₆₂₋₆₈₉比は直線的に増加したことがわかる。この結果は、Depsaらによる、同じK⁺培地中で40分間のインキュベーション期間にHeLa細胞中のNa⁺濃度が10 mMから35 mMに直線的に増加したという報告と良く一致しており、NaGYが生体細胞中において生物学的に関連する濃度範囲内でNa⁺濃度の変化を調べることができることを示唆している。

30

【0099】

以上より、本発明のホスホール化合物は、ベンゾホスホール - P - オキシド蛍光色素分子に基づくNa⁺のレシオメトリック蛍光プローブとして使用することができる。このプローブは、可視光（λ_{ex} = 405 nm）を用いて励起させることができ、Na⁺と錯体形成することで発光スペクトルに浅色シフトを示すものである。レシオメトリック分析は、細胞間Na⁺濃度の変化をモニターするのに適するNa⁺解離定数（K_d = 16.0 ± 1.2 mM）を示した。このプローブを用いることにより、生きている哺乳動物細胞においてNa⁺ / K⁺ポンプをブロックすることにより起きる細胞間Na⁺動力学のレシオメトリック可視化が証明された。それゆえ、このプローブは、例えば電位に誘発されたNa⁺の流入に関連した、ニューロン細胞におけるNa⁺動力学の観測における診断ツールとして使用されることが期待できる。

40

【0100】

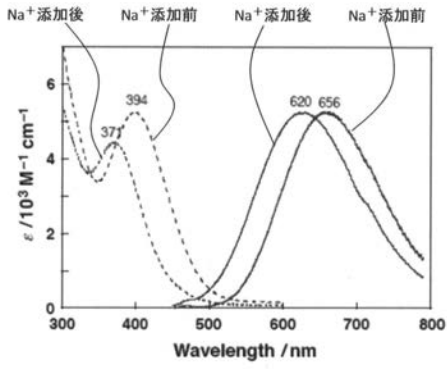
なお、本発明は上述した実施例に何ら限定されることはなく、本発明の技術的範囲に属する限り種々の態様で実施し得ることはいうまでもない。

【産業上の利用可能性】

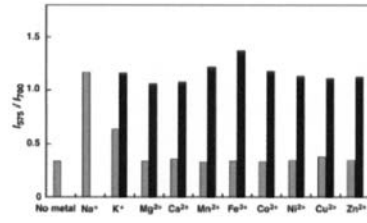
【0101】

本発明は、化学産業に利用可能であり、例えば、生体蛍光イメージングのための蛍光色素などに利用可能である。

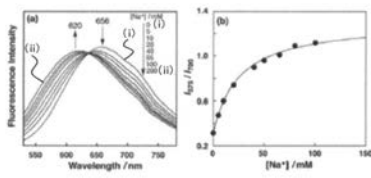
【 図 1 】



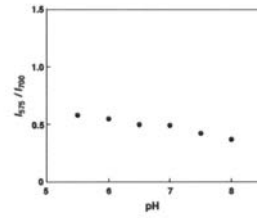
【 図 3 】



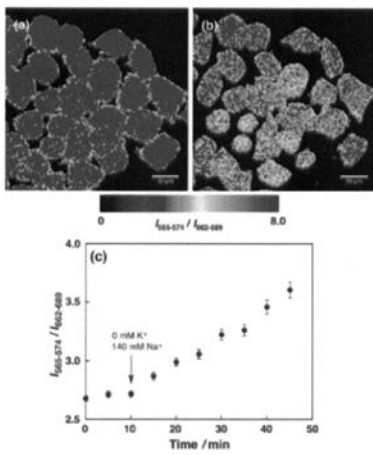
【 図 2 】



【 図 4 】



【 図 5 】



フロントページの続き

特許法第30条第2項適用申請有り (1-1)発行日 2015年3月11日 刊行物 日本化学会 第95
春季年会(2015)講演予稿集 (1-2)開催日 2015年3月26日から2015年3月29日 集会
名、開催場所 日本化学会 第95春季年会(2015) 日本大学工学部 船橋キャンパス(千葉県船橋市
習志野台7-24-1) (2)ウェブサイトの掲載日 2015年6月17日 ウェブサイトのアドレス <http://pubs.rsc.org/en/journals/journalissues/cc?e=1#!recentarticles&all> <http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/cc/c5cc03547c#!divAbstract>
(3)ウェブサイトの掲載日 2015年6月30日 ウェブサイトのアドレス <http://orgreact.chem.nagoya-u.ac.jp/Home.html> <http://orgreact.chem.nagoya-u.ac.jp/Publications.html> http://orgreact.chem.nagoya-u.ac.jp/Recent_Publications/entori/2015/6/30_xi_bao_neinatoriumuion_jian_chunotameno_chi_se_fa_guang_xingreshio_xing_ying_guangpurobu.html

(出願人による申告)平成22年度 科学技術振興機構「プロセスインテグレーションに向けた高機能ナノ構造体の創出」、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願