

ドージンニュース

DOJIN NEWS

CONTENTS

Review

[3n]シクロファン類(n=2-6)の
合成、構造、ならびに光化学的性質

山代智子・新名主輝男

連載

ライブセルイメージング技術講座 1

櫻井孝司

Topics on Chemistry

cDNAから作成するRNAiライブラリ

渡辺栄治

2004

ISSN 0385-1516

No.1111

目次

Review

[3_n]シクロファン類(n=2-6)の

合成、構造、ならびに光化学的性質

九州大学先端物質化学研究所 山代智子・新名主輝男 1

ライブセルイメージング技術講座 1

浜松医科大学光量子医学研究センター 櫻井孝司 14

Topics on Chemistry

cDNA から作成する RNAi ライブラリ

同仁化学研究所 渡辺栄治 17

Commercial

新製品案内

陽イオン性脂質遺伝子導入試薬 21

膜タンパク質可溶化剤 22

試作品

アルカリホスファターゼ標識用キット 18

Q&A

ペルオキシダーゼ標識用キット 20

お知らせ

第 15 回フォーラム・イン・ドージン開催のご案内 17

Peroxidase Labeling kit-SH 仕様変更 20

残留塩素測定キット色調比色計改良 22

製品案内

容量、価格は下記ページをご覧ください。

Peroxidase Labeling Kit-NH₂ 20

Peroxidase Labeling Kit-SH 20

-DoFect- GT1 21

3-Oxatridecyl- α -D-mannoside 22

n-Decyl- β -D-maltoside 22

n-Dodecyl- β -D-maltoside 22

n-Octyl- β -D-glucoside 22

残留塩素測定キット-SBT 法 22

残留塩素測定試薬-SBT 法 22

色素液 22

検水調整液 22



同仁化学研究所があるテクノロジーパークの初夏は、目にも鮮やかな新緑に包まれています。

今号から表紙を一新いたしました。いかがでしょうか。

新たな気持ちで、皆様のお役に立つ情報をお届けしようと思っております。

[3_n]シクロファン類(n = 2-6)の合成、構造、ならびに光化学的性質 Synthesis, Structure, and Photochemical Properties of [3_n]Cyclophanes (n = 2-6)



山代 智子
(Satoko Yamashiro)
九州大学先端物質化学研究所



新名主輝男
(Teruo Shinmyozu)
九州大学先端物質化学研究所

[Summary]

Synthetic methods of [3_n]Cyclophanes ([3_n]CPs: n = 2-6) including the ultimate member of this series, [3₆]CP, were developed, and their structural properties both in solution and in the solid state were examined. [3_n]CP showed significantly strong π-electron-donating ability and this was attributed to the effective hyperconjugation between the benzyl methylene and the benzene ring. [3_n]CPs served as good ligands for Ru(II) and Os(II) metals, and mono-, di-, and trinuclear Ru(II)- [3_n]CP complexes were prepared and their redox properties were studied. [3_n]CP (n = 2, 4) reacted with dicyanoacetylene to give barrelenophane, which led various valence isomers on photolysis. All cyclophanes show excimer fluorescence spectra, whose lifetimes become gradually longer as the number of the bridge increases. The [3_n]CPs (n = 2-6) except for n = 3 and 6 show the excimer phosphorescence spectra with non-vibrational level and their lifetimes are comparable to that of mesitylene. The transient absorption spectra of [3_n]CPs obtained after 266 nm laser photolysis were assigned to their triplet states. Photochemical conversion of the [3_n]CPs to hexaprismane derivatives was examined. Irradiation of [3₃](1,3,5)CP with a low-pressure Hg lamp in dry or wet CH₂Cl₂ afforded bishomopentaprismyl chloride or its hydroxy analogue and triply bridged hexacyclic dienol. The photolysis also proceeded in MeOH in the presence of a proton source to give new polycyclic caged dimethoxy and methoxy-hydroxy compounds with a novel pentacyclododecane skeleton, in addition to the methyl ether. Photolyses of [3₄](1,2,3,5)- and (1,2,4,5)CPs in wet CH₂Cl₂ gave polycyclic diols with the novel skeleton. These isolated photoproducts may be derived from the once-formed hexaprismane derivative. In order to isolate hexaprismane derivative, photolysis of fluorinated [3₃](1,3,5)CP and solid state photochemical reaction of the [3₃](1,3,5)CP-γ-cyclodextrin (1:1) complex are in progress.

キーワード：シクロファン、電子供与体、電荷移動錯体、結晶構造、環状付加反応、バレン、立体配座解析、光化学反応、ブリズマン

1. はじめに

新しい構造を有する分子は固有の性質を持つので、新しい分子の開発は世界的な競争のもとにある。分子が世界を変えるとされている。クラウンエーテル、フラーレン、カーボンナノチューブ等々、その時代を風靡する新物質の発見は世界に大きなインパクトを与え続けている。

ベンゼンに代表される芳香族化合物は、π電子供与体、遷移・希土類金属の配位子、ゲスト取り込みの疎水性部として働く他、興味ある光物理的性質を示すと予想される。我々はπ電子系を含む構造的、理論的、物性的に興味の持たれる新しい有機分子・有機金属錯体を設計して合成し、それらの構造と性質を明らかにするとともに、水素結合や電子的相互作用のような弱い相互作用に基づく新しい分子集積体の形成とその機能を調べる研究を進めている。ここでは、その中でも、π電子に富んだベンゼン環を強制的に接近させた場合に、どのような電子的相互作用が生じ、どのよう

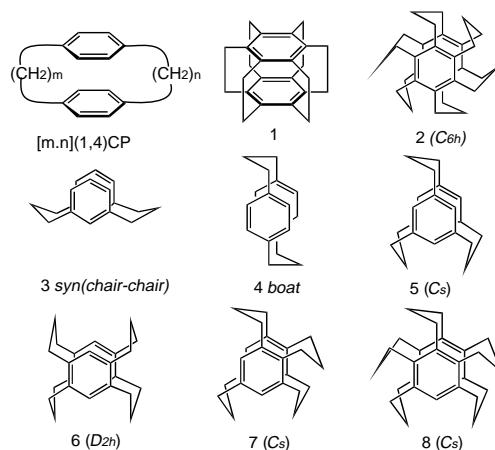


Fig. 1 [m.n](1,4)CP, [2₆]CP 1 and [3_n]CP family 2-8, and their most stable conformers in solution.

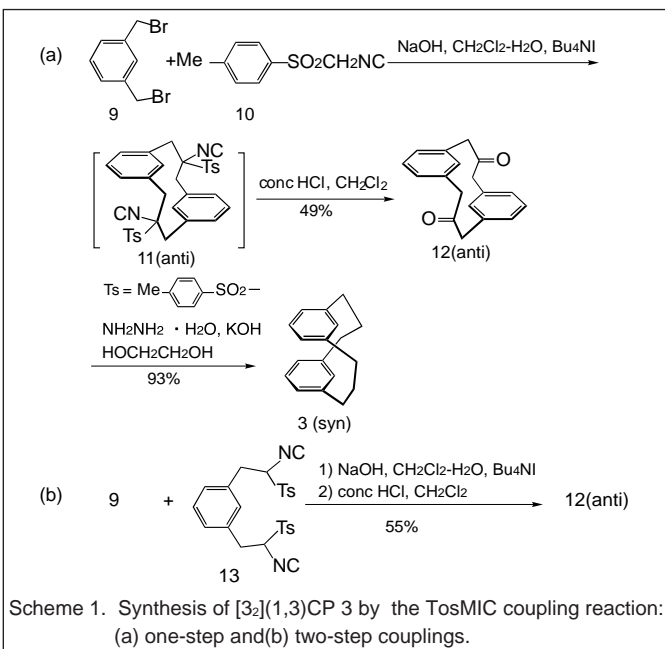
な性質が現れるか、という素朴な疑問から始まった [3_n]cyclophane 類([3_n]CP: n = 2-6)に関する研究を紹介したい。

二個の芳香環を m および n 個のメチレン鎖で架橋した [m.n]-(1,4)cyclophane ([m.n](1,4)CP: n = m = 2-6, Fig. 1)の中で、m = n = 3 が最大の π 電子相互作用を示すことが知られており¹⁾、電子的相互作用を調べるモデルとしては [3_n]CP が最も優れている。また、[3_n]CP は対応する [2_n]CP に比較してベンゼン環の歪みが小さく分子がより柔軟なので、溶液状態における分子の動きを調べるモデルとしても優れている。我々は(1) [3_n]CP 類で最大の π 電子供与性、(2) 溶液および結晶中における分子構造、(3) 光物理的性質および光化学反応、を明らかにする目的で、この分野の究極の化合物である [3₆]CP 2 の合成を計画した。この研究のスタート時点で 2 の低級同族体である [2₆]CP 1 が Boekelheide らにより合成され "superphane" と名付けられていた (1979 年)^{2,3)}。ここでは、2 とその合成中間体である [3_n]CP 類 (n = 2-5, 3-8) の合成、構造と性質、ならびに光化学的性質について、これまでの我々の研究成果を紹介する。

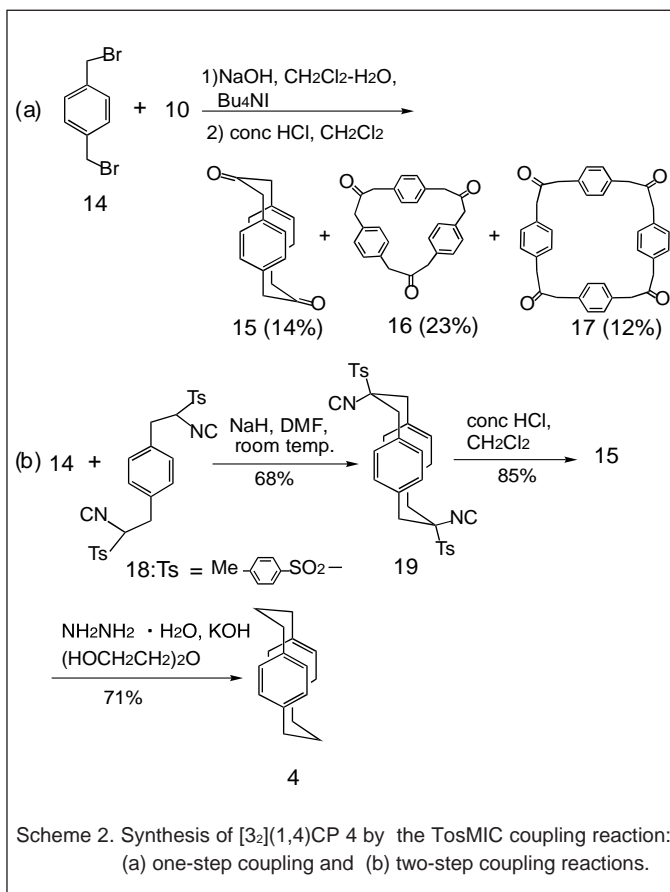
1. [3_n]CP 類 (n = 2-6) の合成

1.1. [3₂]CP 類 [3₂]CP 類の一般的合成法としては、稲津らにより開発された *p*-tolylsulfonylmethyl isocyanide (TosMIC 10) をカルボニル等価体を用いる TosMIC 環化法が最も有用である^{4,5)}。この方法では TosMIC 10 が大量に必要になるが、これは *p*-tolylsulfonylmethylformamide の脱水反応により比較的簡単に大量合成 (kg) できる^{6,7)}。

bromide 9 と TosMIC 10 を NaOH 存在下、相関移動触媒条件下 (Bu₄NI, CH₂Cl₂-H₂O) に反応させ、生成した cyclic TosMIC adduct 11 を単離することなく塩酸処理すると [3₂](1,3)CP-dione 12 が高収率で得られる (Scheme 1-a)。adduct 13 を単離してから bromide 9 と反応させると収率は向上する (Scheme 1-b)⁸⁾。相関移動触媒条件の代わりに NaH/DMF も使用できる⁹⁾。前者の場合には反応溶媒として CH₂Cl₂ を使用するので廃液処理が問題となる。



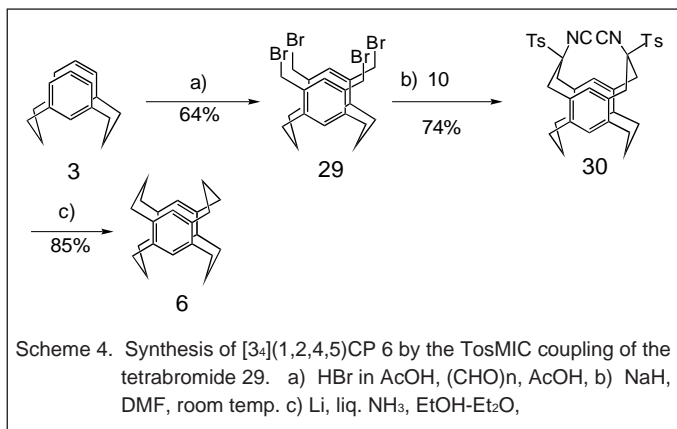
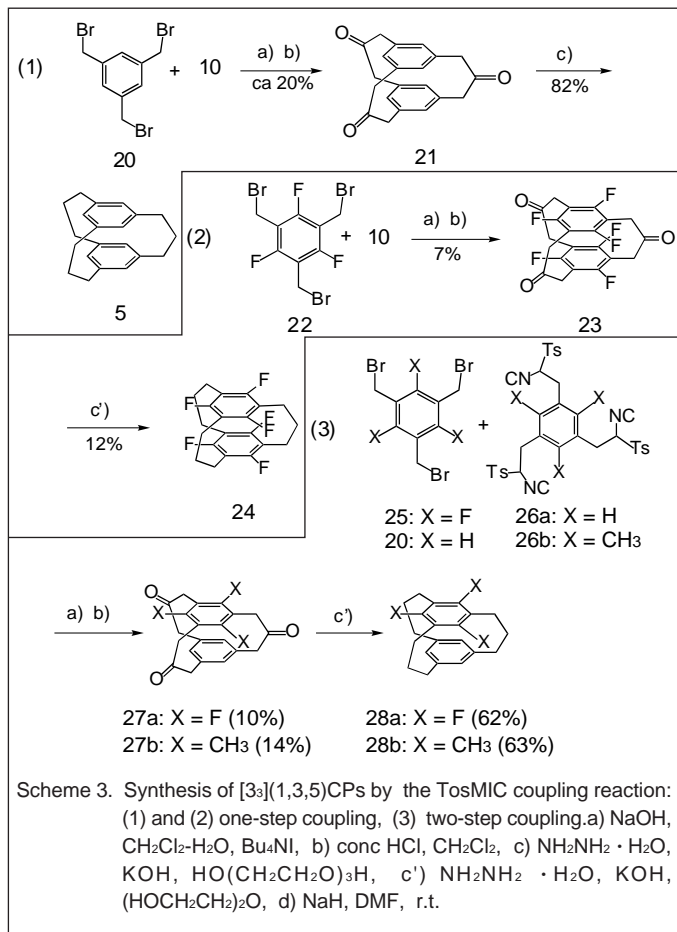
[3₂](1,4)CP 4 は一段階 TosMIC 環化では三量体 16 が主生成物になるので二段階環化が適している (Scheme 2)^{4a)}。DMF 中 NaH 存在下に室温で bromide 14 と TosMIC adduct 18 を反応させて cyclic adduct 19 を単離し、酸加水分解して得られる ketone 15 を Wolff-Kischner 還元することにより 4 が収率良く得られる¹⁰⁾。



1.2. [3₃](1,3,5)CP 類 同様にして [3₃]CP 類も合成できる (Scheme 3)。bromide 20 と TosMIC 10 との一段階環化で triketone 21 が 15-20% で得られる¹¹⁾。20 と TosMIC adduct 26a との二段階環化がより高い収率で 21 を与えるが、一般的に 26 のような TosMIC adduct は純粋に単離するのが困難であるので、置換様式の同じ benzene 環を含む [3₃]CP 類の合成には一段階環化の方が簡単である。benzene 環の置換様式が異なる [3₃]CP 類 (28) の合成には二段階環化を用いるが、収率は TosMIC adduct 26 の純度に依存する^{12,13)}。

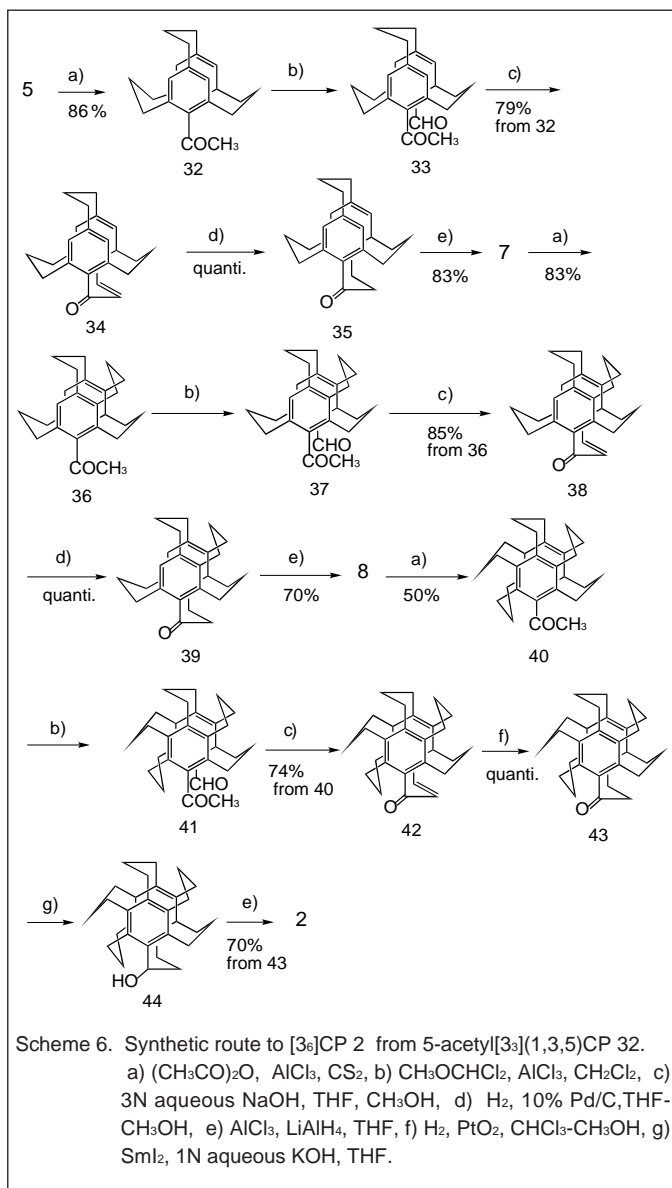
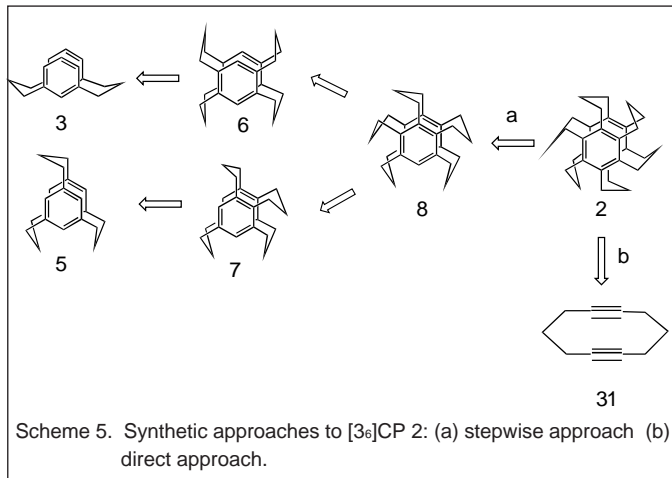
1.3. [3₄](1,2,4,5)CP 類 [3₄](1,2,4,5)CP 6¹⁴⁾ は tetrabromide 29 の NaH/DMF 条件下での TosMIC 環化および cyclic adduct 30 の Li/liq. NH₃ 処理により最も簡単に得られる (Scheme 4)⁸⁾。tetrabromide 29 は [3₂](1,3)CP 3 の bromomethylation により一段階で得られる (64%)^{15,16)}。

1.4. [3₆]CP [3₆]CP 2 の合成ルートとして cyclodeca-1,6-diyne



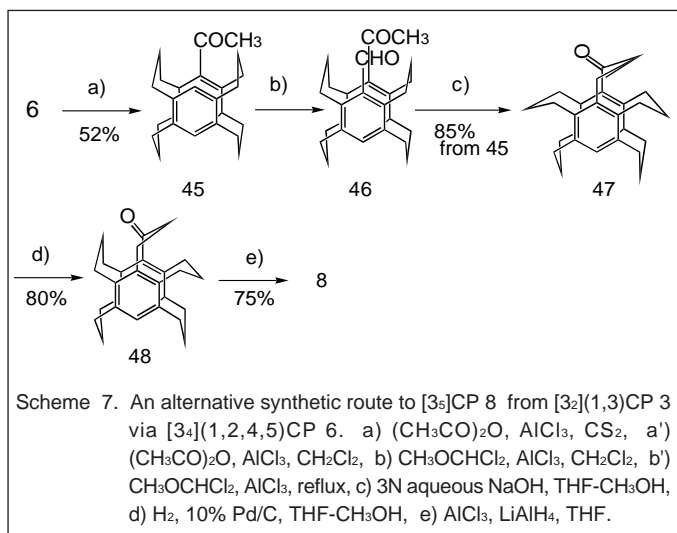
31 の三量化による短段階合成(b)と段階的架橋鎖導入によるルート(a)が考えられる(Scheme 5)。まず、ルート(b)により 31 の三量化反応を幾つかの触媒で試みたが三量体の生成は確認できなかった¹⁷⁾。そこで、ルート(a)に従って段階的に 2 を合成することにし、トリメチレン鎖導入法を種々検討した結果、最終的に acetyl 基と formyl 基の aldol 反応が最も優れていることが分かった(Scheme 6)。

acetyl $[3_3]CP$ 32 を formyl 化すると acetyl 基の配向性効果によ



り formyl 基が acetyl 基の pseudogeminal 位に導入される。33 をアルカリ処理すると aldol 反応が進行し高収率で enone 34 が得られる。34 は二段階還元反応により [3₄](1,2,3,5)CP 7 に変換される。同じ一連の反応により 7 から [3₅]CP 8 が得られる。最終の aldol 反応も高収率で進行し、生成した enone 42 の接触水素化により ketone 43 が得られる。この carbonyl 基の還元は立体障害のために通常の還元剤では還元されないが、アルカリ存在下 SmI₂ で還元されて alcohol 44 を与える。alcohol 44 の還元により目的の 2 の合成が達成された (Scheme 6)¹⁸⁾。

[3₂](1,3)CP 3 から 3 段階で得られる [3₄](1,2,4,5)CP 6 に acetyl 基と formyl 基を導入した 46 の aldol 環化により収率良く enone 47 が得られ、2 段階還元により [3₅]CP 8 に変換できるので、このルートは 8 の短段階合成法として優れている (Scheme 7)¹⁹⁾。



以上のようにして [3₃]CP 5 から目的の [3₅]CP 2 の合成が達成されるとともに (3 から 16 段階、総収率 7%) 一連の [3_n]CP 類 (n = 2-5) の合成法が確立できた。しかしながら、未だ合成法改善の余地は残されている。

2.[3_n]CP 類の構造と性質

電子供与性 π 電子の豊富な benzene は電子供与体として働き、一方、Fig. 2 に示したような π 電子不足の分子は電子受容体として働く。このような電子供与体と受容体を溶液中で混合すると電荷移動(CT)錯体が生成し、錯体は可視領域に吸収帯を持つようになるので着色する (CT 吸収帯)。Fig. 3 に [m.n](1,4)CP (m = n = 2-6) と tetracyanoethylene (TCNE) との CT 錯体の例を示す。[m.n](1,4)CP の電子供与性が増加するにつれて CT 吸収帯

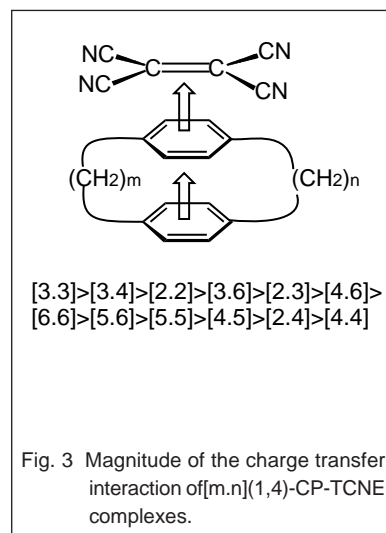
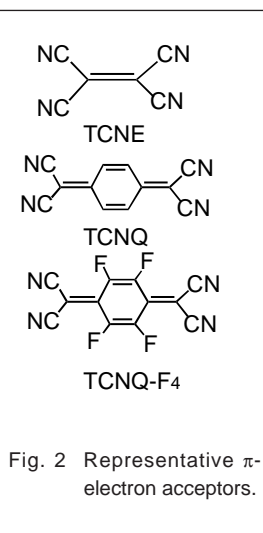
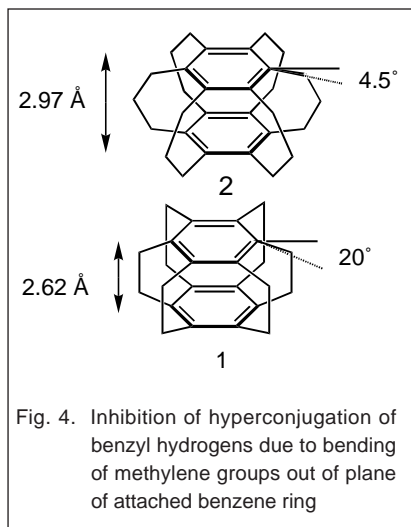


Table 1. Electronic spectral data of multibridged [2_n]- and [3_n]CPs and position of the longest wavelength absorption bands in the electronic spectra of their TCNE and TCNQ complexes, together with the values for the corresponding methylated benzene analogues.



[3 _n]CP	electronic absorption band λ _{max} (nm) ^a	TCNE complex λ _{max} (nm) ^a	TCNQ complex λ _{max} (nm) ^a	[2 _n]CP	electronic absorption band λ _{max} (nm) ^b	TCNE complex λ _{max} (nm) ^b	methylated benzene analogues λ _{max} (nm) ^c
5	261 (ε 1660) 305 (ε 91)	594	658	5	258 (ε 1200) 312 (ε 96)	559	461
7	274 (ε 1778) 319 (ε 79)	632	742	7	207 (ε 71300) 222 (sh, ε 14100) 248 (sh, ε 2030) 287 (sh, ε 370) 308 (ε 195)		480
8	275 (ε 1950) 328 (ε 63)	684	854	8	294 (ε 352) 313 (ε 200)	570	520
2	273 (ε 1698) 342 (ε 65)	728	916	1	296 (ε 421) 306 (sh, ε 394) 311 (sh, ε 324)	572	545

^aMeasured in chloroform. ^bY. Sekine, V. Boekelheide, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 1777 (1981). ^cR. E. Merrifield, W. D. Phillips, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 2778 (1958).

は長波長に移動するので、この吸収帯の位置（正確には面積）から電子供与性を定性的に評価できる。この方法により、Cramらは[m.n](1,4)CP ($m = n = 2-6$)の中で、 $m = n = 3$ が最大のCT相互作用を示すことを報告している(Fig.3)¹⁾。

Table 1 に一連の[3_n]CP 類、Boekelheide らの[2_n]CP 類、および対照化合物としてのpolymethylbenzene 類のTCNE 錯体のCT 吸収帯の位置をまとめた¹⁸⁾。参考のために[3_n]CP-TCNQ 錯体のCT 吸収帯の位置も示す^{19a)}。[3_n]CP-TCNE 錯体では架橋鎖の数が1 個増えるにつれてCT 吸収帯は約40 nm 長波長側へ移動し、架橋鎖増加の影響がπ 電子供与性に顕著に反映されている。[3₆]CP2-TCNE 錯体のCT 吸収帯(728 nm)は、現在までに報告されているbenzene を含むcyclophane-TCNE 錯体の中で最も長い波長であり、予想通りに2 が非常に強いπ 電子供与性を有することを示している。一方、[2_n]CP-TCNE 錯体においては架橋鎖の増加によるCT 吸収帯の長波長シフトは期待されるほど大きなものではない²⁾。勿論、polymethylbenzene-TCNE 錯体でもメチル基の増加に伴いCT 吸収帯は長波長側へシフトするがその増加の程度は、対応する[3_n]CP-TCNE 錯体よりも小さい。これは[3_n]CP と[2_n]CP の分子構造に原因があると考えられる。X 線結晶構造解析結果によると、benzyl 位炭素のbenzene 環平面からのずれは1 の場合に20°であり²⁾、2 (4.5°)よりもはるかに大きい(Fig.4)¹⁹⁾。従って、[3_n]CP の場合にはbenzene 環とbenzyl-methylene との超共役が有効に働くが、[2_n]CP の場合にはbenzyl 位炭素がbenzene 環平面から大幅にずれるために超共役が阻害されるためであると理解できる。

[3_n]CP 類のπ 電子供与性は酸化電位からより正確に見積もられる。Fig.5 に[3_n]CP 類($n=3-6$)のcyclic voltammogram (Cl₂CHCHCl₂/0.1 M Bu₄NPF₆)を、Table 2 に酸化電位のデータをまとめた¹⁹⁾。

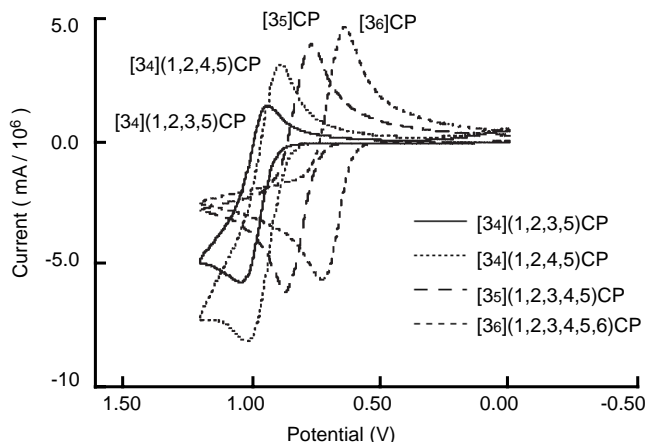


Fig. 5. Cyclic voltammograms of [3_n]CPs (Cl₂CHCHCl₂, 0.1 M Bu₄NPF₆, 25°C, 20 mVs⁻¹)

Table 2. Electrochemical data of [3_n]CPs and fluorinated [3₃]CPs.^a

[3 _n]CP	E _{1/2} (I) (V vs Fc/Fc ⁺)	E _{pa} (I) (V vs Ag/AgCl)	E _{pa} (I) (V vs Fc/Fc ⁺)
[3 ₆]CP	+0.39	+0.73	+0.43
[3 ₅]CP	+0.51	+0.87	+0.57
[3 ₄](1,2,4,5)CP	+0.66	+1.02	+0.72
[3 ₄](1,2,3,5)CP	+0.69	+1.04	+0.74
[3 ₃](1,3,5)CP	—	+1.31	+1.01
Me ₃ [3 ₃](1,3,5)CP ^b (28b)	+0.73	+1.09	+0.79

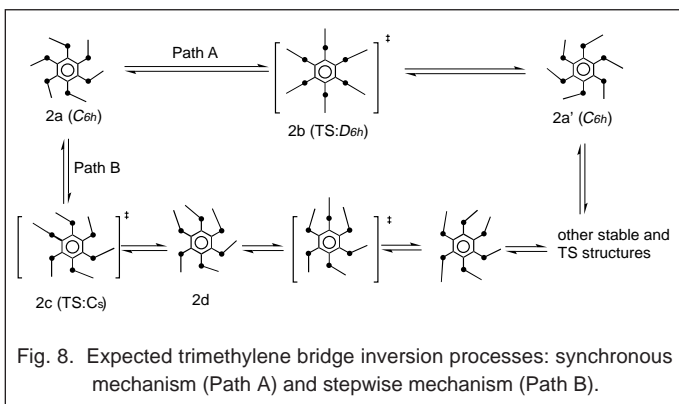
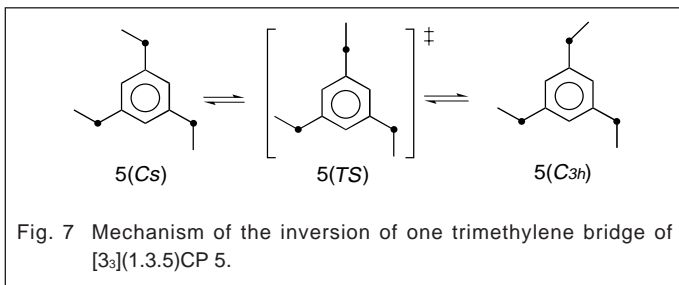
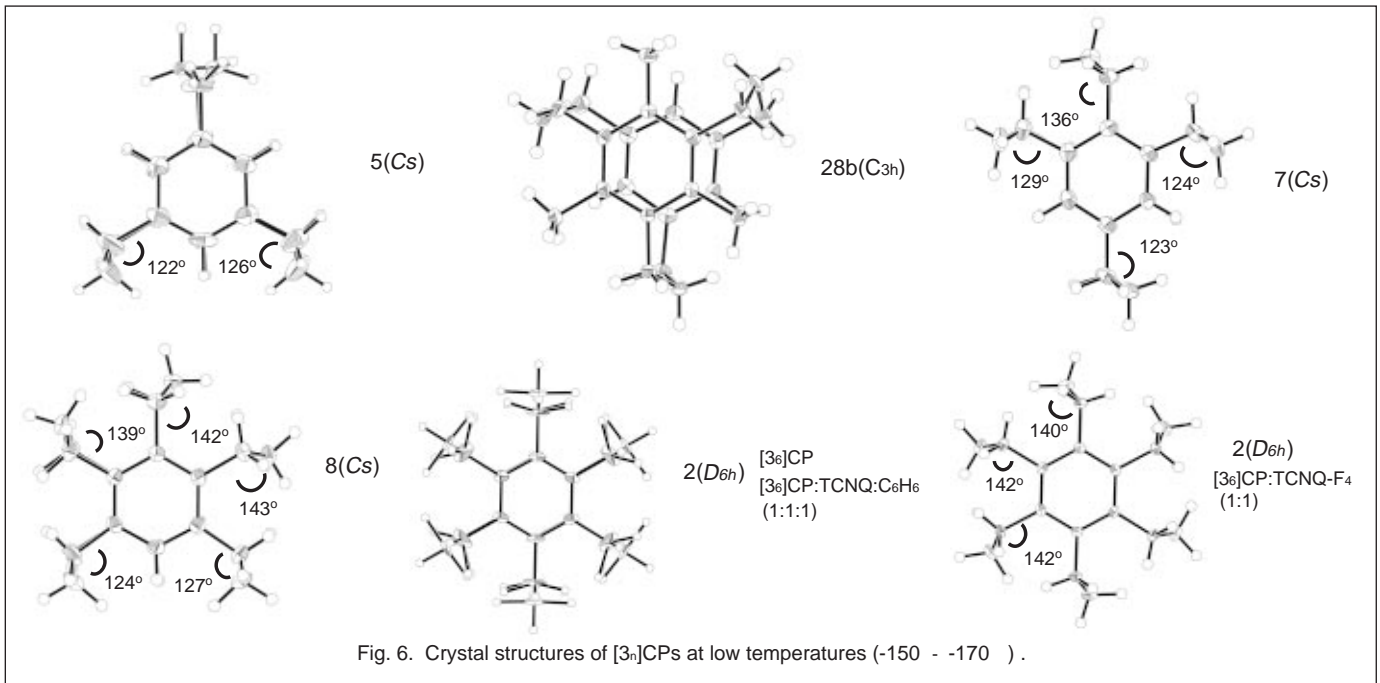
^a In 1,1,2,2-tetrachloroethane containing 0.1 M *n*-Bu₄NPF₆ at 25°C; scan rate 20 mVs⁻¹. ^bscan rate 100 mVs⁻¹.

$n > 3$ 以上では可逆的な酸化還元過程が観測され、半波酸化電位 ($E_{1/2}$)は架橋鎖数の増加とともに減少し、 $n=6$ の場合に +0.39V (vsFc/Fc⁺)となり、代表的なドナーである tetrathiafulvalene (TTF)に匹敵する電子供与性を示す(Table 2)。一方、 $n = 3$ の場合には非可逆的な酸化還元過程を示す。このように酸化電位のデータからも架橋鎖の増加とともにπ 電子供与性が上昇し、 $n > 3$ 以上では特にπ 電子供与性が大きく $n = 6$ の場合に最高になることが分かった。

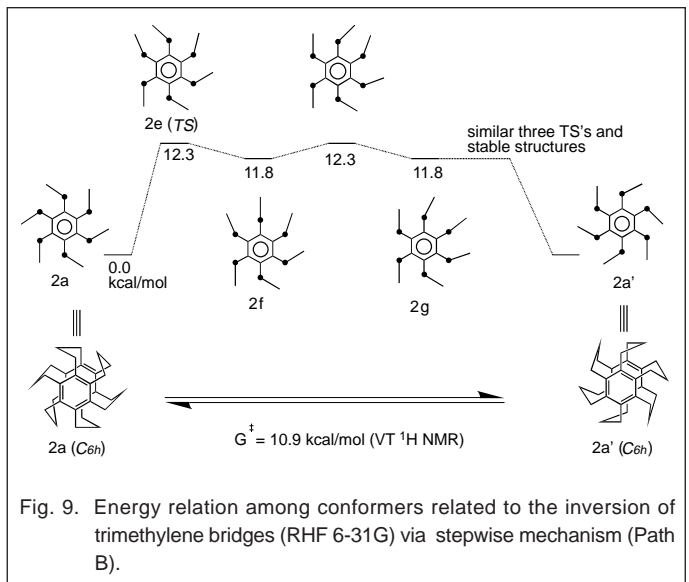
結晶中および溶液中での構造 [3_n]CP 類($n = 3-6$)の結晶中での構造を Fig. 6 に示す。[3_n]CP 類の架橋鎖の二面角は両隣に架橋鎖がある場合に大きくなっている¹⁹⁾。[3_n]CP 類の結晶構造は、Fig. 1 に示した溶液状態における最安定構造と基本的に一致している。対称性の高い[3₆]CP 2は低温(-170 °)においても disorder のために架橋鎖が立った2(D_{6h})構造として観測される。[3₆]CP の構造を固定化する目的で電荷移動錯体[2: TCNQ-F₄ (1:1)]を合成してX 線結晶構造解析を行ったところ、[3₆]CP 部分が最安定配座 (C_{6h})として観測された^{19c)}。

一方、[3_n]CP 類($n = 2-6$)は溶液中では速やかに動いている。分子の動きを観測する方法として温度可変 NMR 法(¹H, ¹³C)が最も有用であり、この方法と理論計算を組み合わせると[3_n]CP 類の溶液状態における構造変化(立体配座解析)を調べた。温度可変 NMR 法では、安定な構造(立体配座)とそれらの相対的な安定性、ならびに反転障壁の情報が得られるが、遷移状態に関する情報が得られないので、遷移状態の構造とエネルギーに関する情報は理論計算から予測する。

[3₂](1,3)CP 3 の場合にはbenzene 環およびトリメチレン鎖の両方の反転が観測されるが^{20,21)}、3 以外は架橋鎖の反転のみが可能なので、反転機構はより単純になる。いずれの化合物においてもトリメチレン鎖は室温では速やかに反転しているが(反転障壁 10-12 kcal/mol)、温度低下とともに反転速度が次第に遅くなり最終的に最安定構造に凍結される。Fig. 1 に示したのがこのようにして求めた最安定構造である。ここでは架橋鎖が独立に動いている例として[3₃]CP 5 を、相関して動いている例として[3₆]CP 2 を選び、これらの反転機構について説明する。



CH_2Cl_2 中、 $[3_3]$ CP 5 の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルは架橋鎖反転に基づく温度依存性を示し、 -70°C では反転が凍結されて C_{3h} と C_s 異性体が 27:73 の比で観測されることから、 C_s 異性体が C_{3h} 異性体よりも 0.4 kcal/mol 安定であることがわかる (Fig. 7)¹¹⁾。温度依存性から求められた反転障壁 (12.4 kcal/mol, $T_c = -7^\circ\text{C}$) は、遷移状態 (TS) の理論計算値 (RHF-6-31G, 13.3 kcal/mol) と一致することから、遷移状態 5 (TS) では 1 つの架橋鎖が平面構造を取ると予想される²²⁾。



$[3_6]$ CP 2 の場合にも架橋鎖プロトンシグナルの温度依存性から、架橋鎖は室温では速やかに反転しているが、温度低下とともに反転速度が遅くなり、 -70°C では反転が完全に凍結され、そのエネルギー障壁は 10.9 kcal/mol ($T_c = -40^\circ\text{C}$) と見積もられた^{18a)}。反転機構として最安定配座 $2a(C_{6h})$ から 6 個の架橋鎖が同時に反転して $2a'(C_{6h})$ に至る機構 (Path A) と架橋鎖が段階的に反転する機構 (Path B) が考えられる (Fig. 8)。理論計算 (RHF 6-31G) は Path A の遷移状態 2b ($TS:D_{6h}$) は $2a(C_{6h})$ よりも 34 kcal/mol も不安定であると予測しているので、Path A の機構は除外できる。Path B では 2e (TS) が遷移状態であり、そのエネルギー (12.3 kcal/mol) は実測の反転障壁 (10.9 kcal/mol) と良く一致することから Path

Bを支持している。従って、一つの架橋鎖が反転して遷移状態2e(7S)に至るには12.3 kcal/molのエネルギーを必要とするが、2個目以降の架橋鎖反転にはわずか0.5 kcal/molのエネルギーしか必要でないため、非常に速やかに反転が進行する(Fig. 9)^{22,23}。このように、2は風車のように6個の架橋鎖が右まわりと左まわりに速やかに反転していると考えられる。

光物理的性質²⁴ 2個のbenzene環がトリメチレン鎖で固定された独特の構造を持つ[3_n]CP類(n = 2-6)の光励起状態の性質を、発光スペクトルおよびレーザーフラッシュフォトリス測定により調べた。[3_n]CP類(n = 2-6)の紫外吸収スペクトルならびに蛍光・リン光スペクトルをFig. 10とTable 3に示す。紫外吸収スペクトルは260 nm付近の強い吸収帯と300 nm付近の弱い吸収帯が特徴的であり、いずれもπ*吸収帯に帰属されるが、後者は2個のベンゼン環が基底状態で相互作用しているために生じる吸収帯であると考えられる。蛍光スペクトルに関しては、いずれのCPについても360から400 nm付近に振動準位を持たないエキシマー蛍光が観測される。リン光に関しては、n = 2, 4, 5の場合にベンゼンダイマーとしてのエキシマーリン光がベンゼン誘導体で初めて観測されたが、n = 3, 6の場合には観測されなかった。[3_n]CP類(n = 2-6)の蛍光量子収率、蛍光寿命、速度定数、リン光寿命をTable 4に示す。比較対照としてmesityleneを示している。

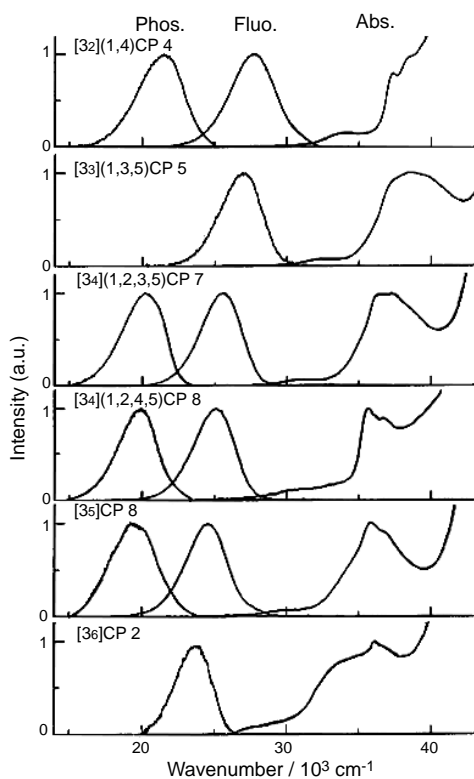


Fig. 10. Absorption, fluorescence and phosphorescence spectra of the [3_n]CPs (n = 2-6). Absorption and fluorescence spectra were obtained in degassed cyclohexane at 295 K. Phosphorescence spectra were obtained in degassed methylcyclohexane / isopentane (3:1 v/v) at 77 K.

Table 3. Maximum wavelengths of absorption and emission spectra of the [3_n]cyclophanes (n = 2-6).

Compound	absorption λ _{max} / nm ^a	fluorescence λ _{max} / nm ^a	phosphorescence λ _{max} / nm ^b
[32](1,4)CP 4	267	360	470
[33](1,3,5)CP 5	258	370	
[34](1,2,3,5)CP 7	270	390	495
[34](1,2,4,5)CP 6	280	400	500
[35]CP 8	280	405	515
[36]CP 2	275	420	

a) In cyclohexane at 295 K. b) In a mixture of methylcyclohexane/isopentane (3:1 v/v) at 77 K.

Table 4. The quantum yields (Φ_f), lifetimes of fluorescence (τ_f), the rate constants for fluorescence (κ_f) in the degassed cyclohexane solution of mesitylene and [3_n]cyclophanes (n = 2-6) obtained at 295 K, and the lifetime of phosphorescence (τ_p) in a mixture of methylcyclohexane and isopentane (3:1 v/v) at 77 K.

Compound	Φ _f ^a	τ _f / ns	κ _f ^b / 10 ⁵ s ⁻¹	τ _p / s
Mesitylene	0.088 ^c	37.3	23.6	6.3
[32](1,4)CP 4	0.012	30.3	4.0	6.0
[33](1,3,5)CP 5	0.013	31.5	4.1	- ^d
[34](1,2,3,5)CP 7	0.019	62.3	3.0	1.7
[34](1,2,4,5)CP 6	0.020	67.8	3.0	3.4
[35]CP 8	0.014	116	1.2	1.2
[36]CP 2	0.004	160	0.25	- ^d

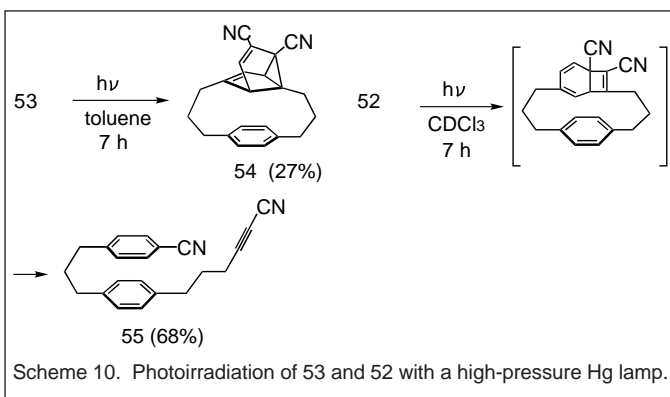
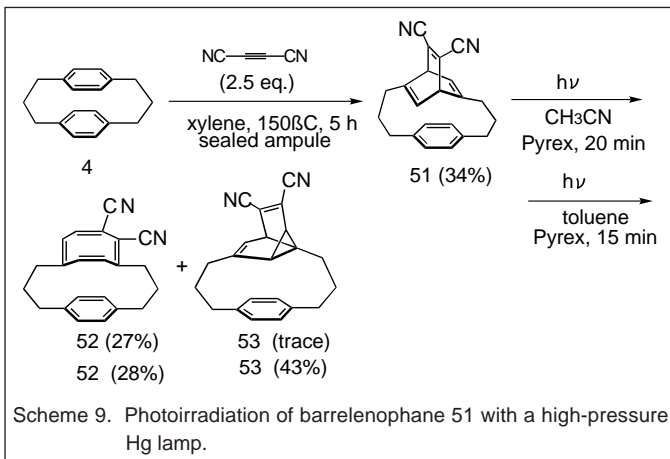
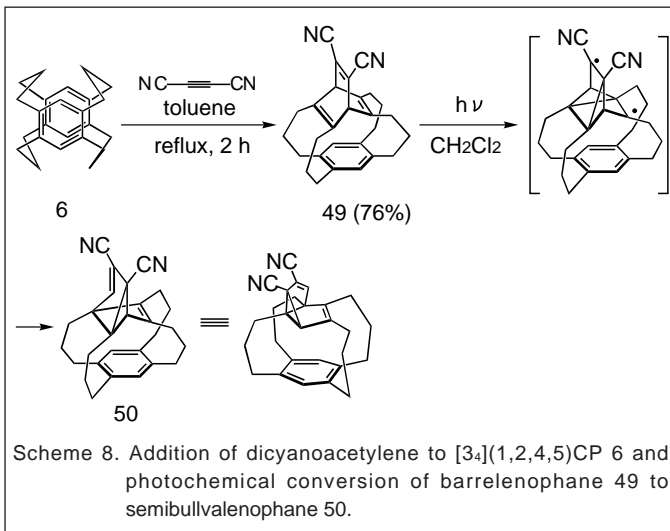
a) Errors -0.001. b) Determined by the equation, κ_fτ = Φ_fτ_f⁻¹. c) Data from *J. Phys. Chem.*, **1972**, 76, 3566. d) No detection.

いずれのcyclophaneも蛍光量子収率はmesityleneに比べて非常に小さい。蛍光の寿命と速度定数は反比例の関係になっている。蛍光寿命に関しては、cyclophaneの架橋鎖が増すにつれて寿命が長くなり、n = 6では160 nsと非常に長い蛍光寿命を持つ。リン光寿命は、いずれのcyclophaneもmesityleneとほぼ同じオーダー(s)の寿命を持っていることから、三重項の電子状態は全てπ-π*であることが分かる。

[3_n]CP類(n = 2-6)の過渡吸収をCH₂Cl₂中で測定した。いずれも400 nm付近に吸収極大を持つ過渡吸収スペクトルを示し、これらの吸収帯は全て酸素の存在によって減少することから、三重項状態に由来する励起状態種であると考えられる。このことは光増感により励起した[3_n]CPの吸収スペクトルの極大波長が過渡吸収スペクトルの吸収波長と一致することにより確認した。また励起一重項状態からの項間交差によって三重項状態が生成することも確認している。n = 3, 6の場合にはリン光は観測されず、これは三重項状態からの失活速度が他のcyclophaneに比べて速くなっている事に起因すると考えられる。基底状態で既に互いのベンゼン環が相互作用し、また励起状態でもその構造を非常に強固に保持している[3_n]CP類の光励起・失活過程は、励起状態では分子内エキシマー状態で非常に長く留まり、項間交差によって三重項状態にエネルギー移動するか、無放射失活過程を経て基底状態に失活してしまうかのどちらかであると考えられる。

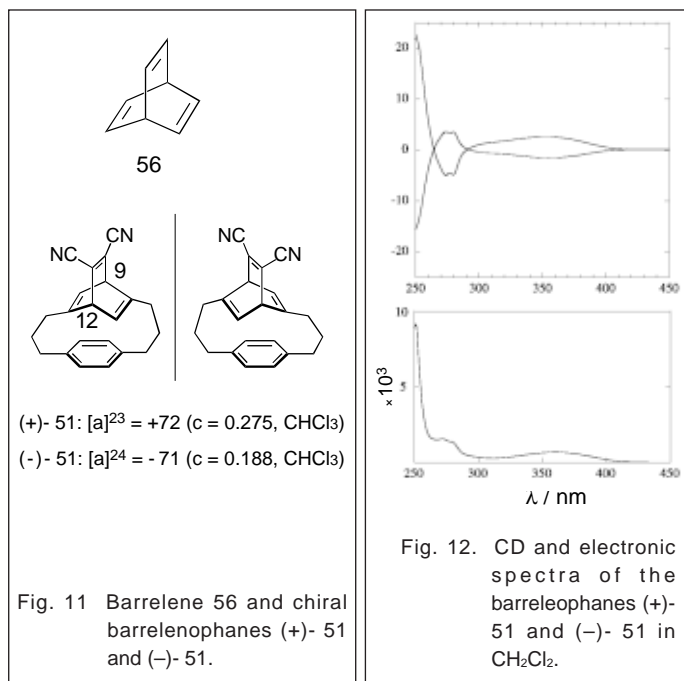
環状付加反応 [3_n]CP類は分子歪みを持つために benzene 誘導体に比較して環状付加反応を受け易い。

[3₄]CP 6 は dicyanoacetylene と円滑に反応して barrelenophane 49 を与える (Scheme 8)⁸⁾。49 の CH₂Cl₂ 溶液を光照射 (400W 高圧水銀灯) すると定量的に semibullvalenophane 50 に変換する。[3₂]CP 4 は dicyanoacetylene とより厳しい条件下で反応して barrelenophane 51 を与え、この CH₃CN 溶液を光照射

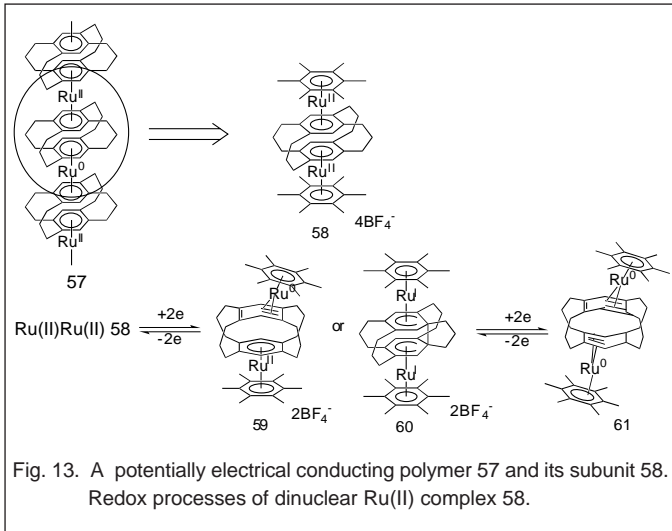


すると COT-phane 52 が得られる¹⁰⁾。toluene 中で照射すると 52 と semibullvalenophane 53 が生成し、53 が主生成物となる (Scheme 9)。これは 51 の一重項経路の反応で COT-phane 52 が、三重項経路で 53 が生成するためと考えられる。興味深いことに、53 を toluene 中で照射するともう一つの semibullvalenophane 54 に変換する。また、COT-phane 52 を CHCl₃ 中で照射すると鎖状化合物 55 を与える (Scheme 10)。このように、[3₂]barrelenophane 51 は光反応条件により様々な変化する変幻自在な化合物であることが分かった。

bicyclo[2.2.2]octa-2,5,7-triene 56 は 1960 年に Zimmerman らによって合成され、π-電子雲が樽状をしていることから barrelene と名付けられた²⁵⁾。barrelene は D_{3h} 対称であるが [3₂]barrelenophane 51 は C₂ 対称で不斉である (Fig. 11)。そこで、(±)-51 の光学分割を行い [CHIRALCEL OD カラム : hexane/2-propanol (1:9)]、光学的に純粋な (+)-51 (比旋光度 +72°: c = 0.275, CHCl₃) と (-)-51 (比旋光度 -71°: c = 0.188, CHCl₃) を得た²⁶⁾。これらの比旋光度と circular dichroism spectra は、これらがお互いに鏡像関係にあることを示している (Fig. 12)。51 の最長波長吸収帯 (354 nm, CH₂Cl₂) は分子内 CT に帰属され、benzene 環 (HOMO) から dicyanoethylene 部分 (LUMO) への渡環 π-π* 遷移帰属できる。比旋光度と CD スペクトルの理論計算結果と実験値の比較から (+)-51 の絶対配置は 9S, 12S、(-)-51 は 9R, 12R と帰属された²⁷⁾。



遷移金属 アレーン錯体 [3_n]CP類は強いπ電子供与性を有するので優れた遷移金属の二座配位子である。57のような [3₄]CP6と金属を交互に配置させた混合原子価状態のポリマーでは、電子の非局在化による電気伝導性の発現が期待される。

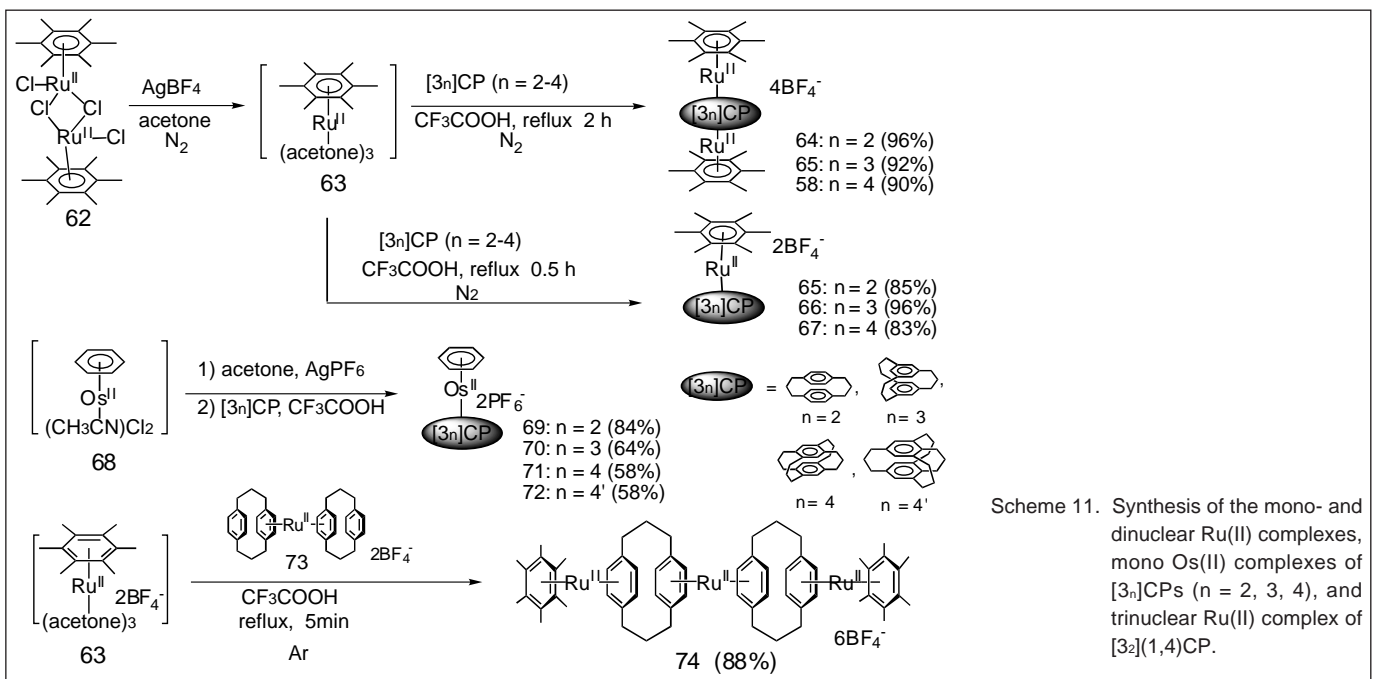
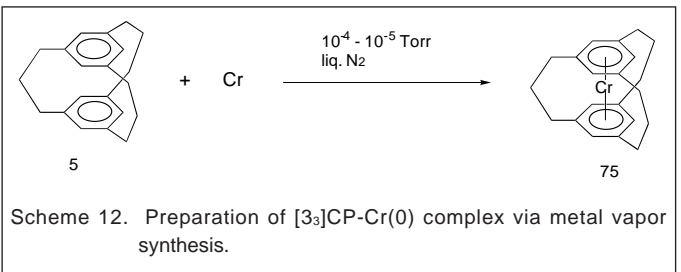


この研究の最初の段階として、ポリマー錯体の構成単位である Ru(II)Ru(II)錯体 58 の 2 電子還元による Ru(0)Ru(II) 混合原子価錯体 59 を合成してその構造と導電性を調べることにした (Fig. 13)²⁸⁾。Scheme 11 に単核、二核、三核錯体の合成法を示す。Bennett らは [RuCl₂(η⁶-arene¹)]₂ (例 62) を acetone と AgBF₄ で処理して得られる acetone solvate (例 63) を arene² と反応させて (η⁶-arene¹)(η⁶-arene²)Ru(II)Ru(II) 錯体を得る一般的な合成法を報告している²⁹⁾。この方法を用いて [3_n]CP 類の種々の単核(65-67)および二核錯体(58, 64, 65)を合成した³⁰⁾。[3_n]CP に対して 63 を大過剰用いると二核錯体が、1 等量用いると単核錯体を得られる。同様にして、単核錯体 73 を 5 等量の 63 と反応させると三核錯体 74 が得られる。

一方、Mann らの方法に従い³¹⁾、[(η⁶-benzene)Os(II)(CH₃CN)Cl₂] 68 を acetone solvate に変換してから [3_n]CP と反応させると Os(II)単核錯体(69-72)が得られる^{30a)}。

種々の Ru(II)Ru(II)二核錯体の電気化学的性質を cyclic voltammetry により調べた (1mM in DMF, 0.1 M Et₄NClO₄)。Fig. 13 に示すように、二核錯体では連続した 2 電子酸化還元過程 [Ru(II)Ru(II) (58) ⇌ [RuRu]²⁺ (59 or 60) ⇌ Ru(0)Ru(0) (61)] が観測されるものの、非可逆過程であり酸化波の強度が還元波に比較して小さい。Ru(II)は cyclophane の benzene 環の 6 個の π 電子と配位(η⁶)しているが、還元されて Ru(0)になると構造変化が起こり、環の 4 個の π 電子に配位した η⁴-錯体になる。現在、[RuRu]²⁺ 錯体が Ru(II)Ru(0) 59 か Ru(I)Ru(I) 60 かを同定するために、Ru(II)Ru(II)錯体 58 の化学還元を行い還元体の単結晶作成を行っている。

また、cyclophane を配位子とするゼロ価の遷移・希土類金属錯体 (例 75) を合成して、新規電子供与体や有機還元剤としての可能性を調べる研究も行っている³²⁾。このような錯体の合成には metal vapor synthesis 法が最適であり^{33,34)}、カナダの Torrova 社の装置を用いて合成を進めている。この方法は希土類金属にも適用できるので、今後種々の新規低原子価錯体が合成できるものと期待している (Scheme 12)。



3. 光化学反応による hexaprismane 誘導体の合成研究^{24,35)}

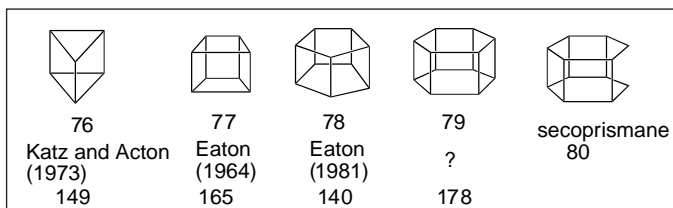
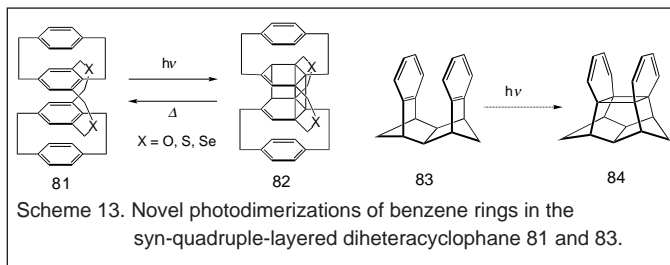


Fig. 14. Prismane family and their calculated strain energies in kcal/mol (RHF/6-31G*, Disch, R. L.; Schulman, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* 1988, 110, 2102-2105).

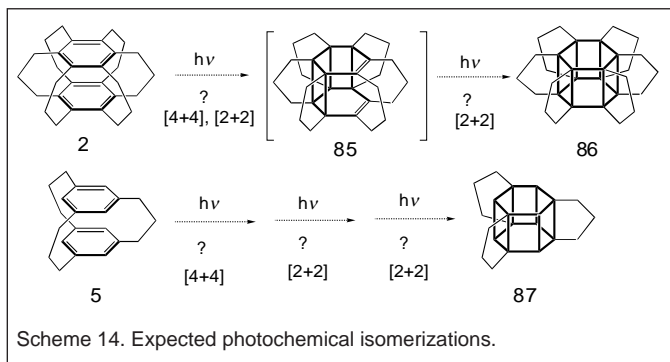
Fig. 14にprismane類と呼ばれている幾何学的な美しさを持つ化合物群を示す。これらの化合物は歪みの大きいcyclobutane環から構成されているので、高い歪みを持つと予想され、合成が困難と考えられていたが、prismane 76、cubane 77、pentaprismane 78の合成が達成され、高歪み化合物であっても安定に存在しうることが実証されてきた³⁶⁾。中でも米国のEatonらは独特の分子構造と高い歪みに興味を持ち、cubane誘導体の系統的研究を続けている³⁷⁾。しかしながら、hexaprismane 79の合成はEatonを初め世界の多数の合成化学者の努力がなされ、その結果、Mehtaらによるsecohexaprismane 80までの合成が成されているにもかかわらず³⁸⁾、79は誘導体をも含めて未知の化合物である。これは、79の歪みエネルギー(178 kcal/mol)が高すぎて安定に存在し得ないためではなく、適当な合成法が開発されていないためであると理解している。[3_n]CPの研究で最後に残された課題の一つが、二個のbenzene環が近接した位置に完全重なり型に固定されている[3_n]CP類の光反応によるhexaprismane誘導体(86, 87)の合成である(Scheme 14)。

benzeneの光二量化反応の例は非常に少なく、我々がこの研究を始めた時点では2例のみが報告されているだけであった。樋口、三角らは4層型cyclophane 81が光照射によりかご型化合物82に変換し、82は熱により81に戻るフォトクロミズム現象を見出している³⁹⁾。また、ドイツのPrinzbachらはbenzene環が近接した化合物83の光反応が進行することを見出しており、この反応を[6+6]環状付加反応と名付けている(Scheme 13)⁴⁰⁾。



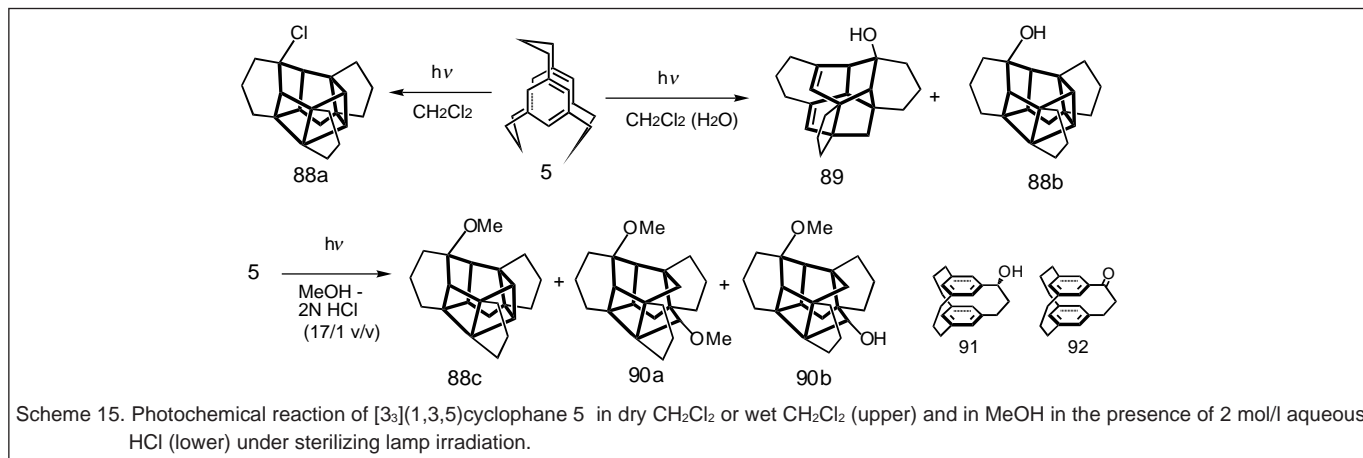
Scheme 13. Novel photodimerizations of benzene rings in the syn-quadruple-layered diheteracyclophane 81 and 83.

[3_n]CPの光反応は、[4+4]反応による光二量化と引き続いての[2+2]反応によりdiene (85)が生成し、最後の[2+2]反応によりhexaprismane誘導体(86, 87)が生成すると予想している。中間体dieneの光[2+2]反応が禁制か許容かについては、大澤らにより半経験的分子軌道法計算に基づく定性的判断法が報告されている(結合経由軌道相互作用)。この予測によるとdiene 85の[2+2]反応は、許容か禁制の境目であるとされている⁴¹⁾。最近、共同研究者のLimらは87の理論計算(B3LYP/6-31G*)を行い、この化合物は光反応前駆体[3₃]CP 5より131 kcal/mol高いエネルギーを持つが、結合距離は正常な値を示すので、単離するに十分な安定性を持っていると予測している⁴²⁾。



Scheme 14. Expected photochemical isomerizations.

我々はまず、合成の容易な[3₃]CP 5を用いて光反応条件の詳細な検討を行った。その結果、5の無水CH₂Cl₂溶液をArガスを通しながら滅菌灯(254 nm)により照射すると、原料回収(40%)の他に塩素化されたbishomopentaprismane骨格を有する88a (5.3%)が単離され、この反応を含水CH₂Cl₂溶液で行うと、原

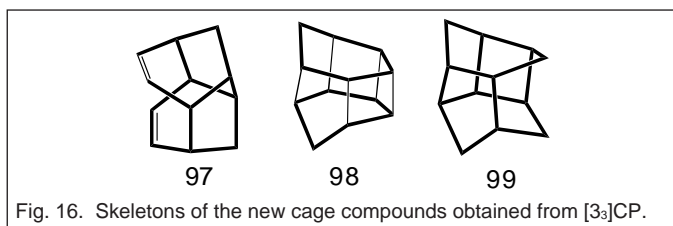
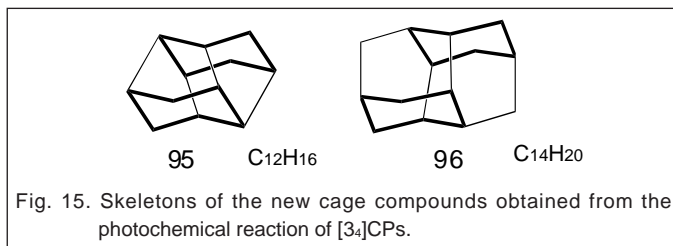
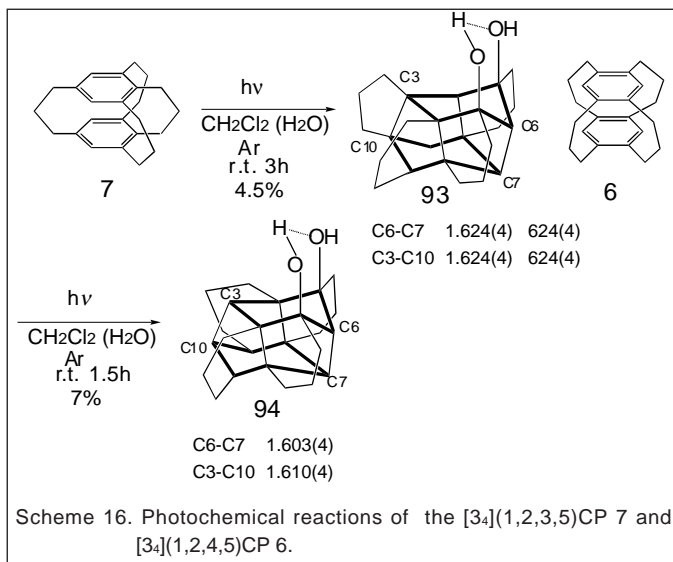


Scheme 15. Photochemical reaction of [3₃](1,3,5)cyclophane 5 in dry CH₂Cl₂ or wet CH₂Cl₂ (upper) and in MeOH in the presence of 2 mol/l aqueous HCl (lower) under sterilizing lamp irradiation.

料回収(18%)の他に二種類の生成物、olefin-alcohol 89 (17%)と bishomopentaprismane 骨格を有する alcohol 88b (5.4%)が単離された (Scheme 15)^{43a)}。

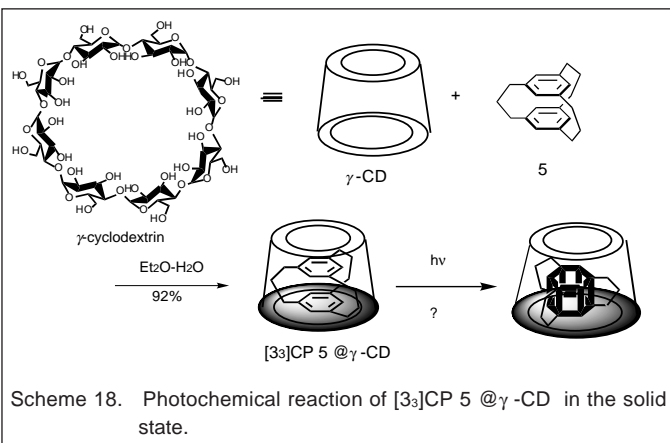
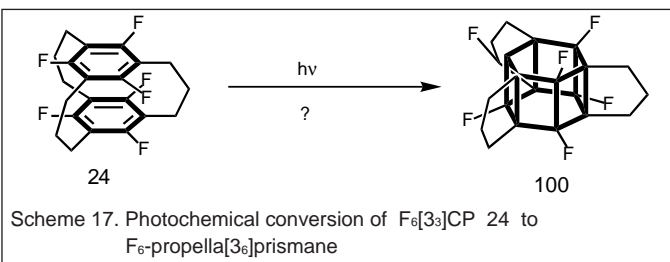
CH₂Cl₂ 溶液中で光照射すると溶液が次第に酸性になることから、プロトンが反応に関係しているのではないかと疑われたので、酸存在下で反応を行ったところ予想通りに反応は進行し、methyl ether 88c が得られた。しかし、88c の cyclobutane 環が更にプロトン化を受けて生成したカルボカチオンが methanol か水で捕足されたジメトキシ化合物 90a およびメトキシヒドロキシ化合物 90b も生成し、照射時間を長くすると 90a の収率が向上した (57%)^{43b)}。反応溶媒に pentane を用いると二量化反応は進行せず微量の酸化生成物 91, 92 が得られた^{24a)}。

次に [3₄]CP 類の光反応を行った。7 の含水 CH₂Cl₂ 溶液に Ar ガスを通じながら室温で 3 時間滅菌灯照射を行い、反応混合物をシリカゲルクロマトグラフィーで分離精製すると、原料(40%)とともにかご型 diol 93 (4.5%)^{44a)} が得られた。同様に 6 の反応で原料回収(45%)とともに 93 と同じ基本骨格を持つ diol 94 (7%)^{44b)} が生成した。



基本骨格である pentacyclo[6.3.0.^{14,11}.0^{2,6}.0^{5,10}]dodecane 95 は C₁₂H₁₆ ファミリーの一員として Evtushenko らにより考案されていたが⁴⁵⁾、その合成は報告されていないので、93, 94 はこの骨格を含む初めての化合物となった。また、この基本骨格は Schleyer らの diamantan 96 (congressane) を連想させるが⁴⁶⁾、95 では 2 個の椅子型シクロヘキサン環が 4 箇所直接連結している点で 96 と異なる。連結箇所の炭素 - 炭素結合距離 (93: C6-C7 1.624 Å, C3-C10 1.624 Å; 94: C6-C7 1.603 Å, C3-C10 1.610 Å) は cyclopentane の炭素 - 炭素結合距離 1.552 Å (RHF/6-31G*) よりも異常に長くなっている。

これらの多環状かご型化合物の生成機構としては、光照射によりまず hexaprismane 誘導体が生成するが、これらは高い歪みを持つために反応溶液中で容易にプロトン化され、生成したカルボカチオン種がさらに安定なカチオン種に転位し、最終的に求核剤で補足されるのではないかと予想している²⁴⁾。hexaprismane 誘導体の単離までには至っていないものの、[3_n]CP 類の光照射により新しい基本骨格(95, 97-99)を有するかご型化合物が生成することを見出した (Fig. 16)。



hexaprismane 誘導体の単離を目指して、hexaprismane 骨格の熱力学的安定化と化学的不活性化のためにフッ素化した [3₃]CP 24 の光反応を行っている (Scheme 17)^{12,47a)}。また最近、 γ -cyclodextrin (γ -CD) の水溶液 と [3₃]CP 5 の diethyl ether 溶液を混ぜると 1:1 包接錯体が固体として析出することを見出した。この包接錯体に固体状態あるいは不溶性溶媒中で光照射して hexaprismane 誘導体が生成するかどうかを調べている (Scheme 18)^{47b)}。これまでに、F₆[3₃]CP 24 が CH₂Cl₂ 溶液中での光照射で反応すること、ならびに、 γ -CD-[3₃]CP 5 (1:1) 包接錯体が光反応を受けることを確認しており、現在、光生成物の単離・精製を行っ

ている。これらの試みが、近い将来 hexaprismane 誘導体単離につながることを期待したい。

おわりに

[3₆]CP 2 の合成を目指してスタートしたこの研究の過程で、目的の2だけでなくその低級同族体3-8も強い電子供与性を持ち、遷移金属の優れた配位子であり、光学的にも面白い性質を持つことを明らかにすることができた。現在、[2₂](1,4)CP が市販されている唯一の cyclophane であり、この化合物は電子材料や、最近特に不斉配位子の骨格として広く用いられている⁴⁸⁾。[2₂](1,4)CP の代わりに、例えば[3₂](1,4)CP 4も同じ目的で利用できるものと予想されるので、今後、我々の開発した [3_n]CP 類が、少しでも世の中のお役に立てるように努力したいと考えている。

謝辞：この研究は研究室の学生諸君を初め、数多くの学内外の共同研究者の献身的な協力の賜物であり心から謝意を表します。

参考文献

- D. J. Cram, R. H. Bauer, *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 5971 (1959).
- (a) Y. Sekine, M. Brown, V. Boekelheide, *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 3126 (1979). (b) Y. Sekine, V. Boekelheide, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 1777 (1981). (c) V. Boekelheide, *Acc. Chem. Res.*, **13**, 65 (1980).
- S. El-tamany, H. Hopf, *Chem. Ber.*, **116**, 1682 (1983).
- (a) K. Kurosawa, M. Suenaga, T. Inazu, T. Yoshino, *Tetrahedron Lett.*, **23**, 5335 (1982); (b) T. Shinmyozu, Y. Hirai, T. Inazu, *J. Org. Chem.*, **51**, 1551 (1986).
- H. Sasaki, T. Kitagawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 2868 (1983).
- (a) O. Possel, A. M. van Leusen, *Tetrahedron Lett.*, 4229 (1977); (b) D. van Leusen, A. M. van Leusen, *Synthesis*, 325 (1980).
- B. E. Hoogenboom, O. H. Oldenzien, A. M. van Leusen, *Org. Synth.*, **57**, 102 (1977).
- W. Sentou, T. Satou, C. Lim, M. Yasutake, Y. Sakamoto, T. Itou, T. Shinmyozu, *Eur. J. Org. Chem.*, 1223 (1999).
- J. Breitenbach, F. Vötle, *Synthesis*, 41 (1992).
- W. Matsuda-Sentou, T. Shinmyozu, *Eur. J. Org. Chem.*, 3195 (2000).
- T. Meno, K. Sako, M. Suenaga, M. Mouri, T. Shinmyozu, T. Inazu, *Can. J. Chem.*, **68**, 440 (1990).
- T. Koga, M. Yasutake, T. Shinmyozu, *Org. Lett.*, **3**, 1419 (2001).
- M. Yasutake, K. Araki, M. Zhou, R. Nogita, T. Shinmyozu, *Eur. J. Org. Chem.*, 1343 (2003).
- T. Shinmyozu, S. Kusumoto, S. Nomura, H. Kawase, T. Inazu, *Chem. Ber.*, **126**, 1815 (1993).
- S. Breidenbach, J. Harren, S. Neumann, M. Nieger, K. Rissanen, and F. Vötle, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I.*, 2061 (1996).
- T. Oda, T. Shinmyozu, unpublished results.
- Only dimerization products were isolated; T. Shinmyozu, Y. Sakamoto, unpublished results.
- (a) Y. Sakamoto, N. Miyoshi, T. Shinmyozu, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 549-550 (1996). (b) Y. Sakamoto, N. Miyoshi, M. Hirakida, S. Kusumoto, H. Kawase, J. M. Rudzinski, T. Shinmyozu, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 12267 (1996). (c) Review: Y. Sakamoto, T. Shinmyozu, *Recent Res. Devel. in Pure & Applied Chem.*, **2** (1998). (d) 新名主輝男、阪元洋一、安武幹雄、松田若菜、野北里花、秋田素子、林哲澤、佐藤禎治、周銘、有機合成化学協会誌、**60**, 778 (2003).
- (a) M. Yasutake, T. Koga, Y. Sakamoto, S. Komatsu, M. Zhou, K. Sako, H. Tatemitsu, Y. Aso, S. Inoue, T. Shinmyozu, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 10136 (2002). (b) Review: M. Yasutake, T. Koga, C. Lim, M. Zhou, W. Matsuda-Sentou, T. Satou, T. Shinmyozu, *Cyclophane Chemistry for the 21st Century*, H. Takemura, Ed., Research Signpost, Kerala, 266 (2002). (c) M. Yasutake, Y. Sakamoto, S. Onaka, K. Sako, H. Tatemitsu, T. Shinmyozu, *Tetrahedron Lett.*, **41**, 7933 (2000).
- (a) K. Sako, T. Hirakawa, N. Fujimoto, T. Shinmyozu, T. Inazu, H. Horimoto, *Tetrahedron Lett.*, **29**, 6275 (1988). (b) K. Sako, T. Shinmyozu, H. Takemura, M. Suenaga, T. Inazu, *J. Org. Chem.*, **57**, 6536 (1992).
- M. F. Semmelhack, J. J. Harrison, D. C. Young, A. Gutiérrez, S. Rafii, J. J. Clardy, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 7508 (1985).
- K. Hori, W. Sentou, T. Shinmyozu, *Tetrahedron Lett.*, **38**, 8955 (1997).
- H. F. Bettinger, P. v. R. Schleyer, H. F. Schafer III, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 1074 (1998).
- (a) R. Nogita, K. Matohara, M. Yamaji, T. Oda, Y. Sakamoto, C. Lim, M. Yasutake, T. Kumagai, T. Shimo, C. W. Jefford, T. Shinmyozu, *J. Am. Chem. Soc.*, in press. (b) 野北里花、新名主輝男、光化学、**33**, 106 (2002).
- H. E. Zimmerman, R. M. Paufler, *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 1514 (1960).
- W. Matsuda-Sentou, T. Shinmyozu, *Tetrahedron : Asymmetry*, **12**, 839 (2001).
- P. J. Stephens, D. M. McCann, F. J. Devlin, J. R. Cheeseman, M. J. Frisch, *J. Am. Chem. Soc.*, in press.
- (a) E. D. Laganis, R. G. Finke, V. Boekelheide, *Tetrahedron Lett.*, **21**, 4405 (1980); (b) E. D. Laganis, R. H. Voegeli, R. T. Swann, R. G. Finke, H. Hopf, V. Boekelheide, *Organometallics*, **1**, 1415 (1982).
- (a) M. A. Bennett, A. K. Smith, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 233 (1974). (b) M. A. Bennett, T. W. Matheson, *J. Organomet. Chem.*, **175**, 87 (1979). (c) M. A. Bennett, T. W. Matheson, G. B. Robertson, W. L. Steffen, T. W. Turney, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 32 (1979).
- (a) T. Satou, K. Takehara, M. Hirakida, Y. Sakamoto, H. Takemura, H. Miura, M. Tomonou, T. Shinmyozu, *J. Organomet. Chem.*, **577**, 58 (1999). (b) M. Izumi, A. Yoshida, T. Tajiri, T. Satou, W. Matsuda, K. Takehara, H. Takemura, T. Shinmyozu, unpublished results.
- (a) D. A. Freedman, J. R. Matachek, K. R. Mann, *Inorg. Chem.*, **32**, 1078 (1993); (b) D. A. Freedman, D. J. Magneson and K. R. Mann, *Inorg. Chem.*, **34**, 2617 (1995).
- T. Tajiri, A. Yoshida, T. Satou, M. Izumi, K. Takehara, H. Takemura, T. Shinmyozu, unpublished results.
- (a) K. J. Klabunde, *Acc. Chem. Res.*, **8**, 393 (1975); (b) D. F. Schriver, *Inorganic Syntheses*, **19**, 59 (1979).
- (a) C. Elschenbroich, R. Mökel, U. Zenneck, *Angew. Chem. Int. Ed.*

- Engl.*, **7**, 531 (1978); (b) A. R. Koray, M. L. Ziegler, *Tetrahedron Lett.*, **26**, 2465 (1979).
- 35) Review: Chaps. 22 and 23. T. Shinmyozu, R. Nogita, M. Akita, C. Lim, *CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology*, CRC Press LLC, Boca Raton, USA (2004).
- 36) For recent reviews, see. (a) H. Dodziuk, In "Topics in Stereochemistry, Vol. 21", Eliel, E. L.; Wilen, S. H. (Eds), John Wiley & Sons, Inc., 1994. (b) H. Dodziuk, *Modern Conformational Analysis*, VCH Publishers, Inc., 1995. (c) M. A. Forman, *Org. Prep. Proced. Int.*, **26**, 291 (1994).
- 37) For reviews: (a) P. E. Eaton, *Account Chem. Research*, **1**, 50 (1968). (b) P. E. Eaton, *Tetrahedron* **35**, 2189 (1979). (c) P. E. Eaton, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **31**, 1421 (1992).
- 38) G. Mehta, S. Padma, *Tetrahedron Lett.*, **28**, 1295 (1987). (b) G. Mehta, S. Padma, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 2212 (1987).
- 39) (a) H. Higuchi, K. Takatsu, T. Otsubo, Y. Sakata, S. Misumi, *Tetrahedron Lett.*, **23**, 671 (1982). (b) H. Higuchi, E. Kobayashi, Y. Sakata, S. Misumi, *Tetrahedron* **42**, 1731 (1986).
- 40) H. Prinzbach, G. Sedelmeier, C. Krüer, R. Goddard, H-D. Martin, R. Gleiter, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **17**, 271 (1978).
- 41) O. J. Cha, E. Osawa, S. Park, *J. Mol. Struct.*, **300**, 73 (1993).
- 42) C. Lim, Y. W. Kwak, D-K. Kim, C. H. Choi, *J. Mol. Struct.*, **655**, 351 (2003).
- 43) (a) Y. Sakamoto, T. Kumagai, K. Matohara, C. Lim, T. Shinmyozu, *Tetrahedron Lett.*, **40**, 919 (1999). (b) K. Matohara, C. Lim, M. Yasutake, R. Nogita, T. Koga, Y. Sakamoto, T. Shinmyozu, *Tetrahedron Lett.*, **41**, 6803 (2000).
- 44) (a) C. Lim, M. Yasutake, T. Shinmyozu, *Tetrahedron Lett.*, **40**, 6781 (1999). (b) C. Lim, M. Yasutake, T. Shinmyozu, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **39**, 578 (2000).
- 45) A. V. Evtuschenko, M. S. Malchanova, B. B. Smirnov, V. A. Shlyapochnikov, *Russ. Chem. Bull.*, **45**, 2302 (1996).
- 46) C. Cupas, P. von R. Schleyer, D. J. Trecker, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 917 (1965).
- 47) (a) S. Yamashiro, D. Hattori, T. Shinmyozu, unpublished results. (b) S. Yamashiro, T. Shinmyozu, unpublished results.
- 48) S. E. Gipson, J. D. Knight, *Org. Biomol. Chem.*, **1**, 1256 (2003).

著者紹介

氏名：山代 智子 (Satoko Yamashiro)
 年齢：28歳
 所属：九州大学先導物質化学研究所・博士研究員
 連絡先：〒812-8581 福岡市東区箱崎6-10-1
 TEL 092-642-4227 FAX 092-642-2735
 E-mail: toko@ms.ifoc.kyushu-u.ac.jp
 出身大学：熊本大学大学院自然科学研究科
 学位：博士（理学）
 現在の研究テーマ：光反応によるヘキサプリズマン誘導体の合成 / 拡張π電子共役系アズレン化合物の構築と物性

氏名：新名主 輝男 (Teruo Shinmyozu)
 年齢：54歳
 所属：九州大学先導物質化学研究所・教授
 連絡先：〒812-8581 福岡市東区箱崎6-10-1
 TEL 092-642-2716 FAX 092-642-2735
 E-mail: shinmyo@ms.ifoc.kyushu-u.ac.jp
 出身大学：九州大学大学院理学研究科
 学位：博士（理学）

現在の研究テーマ：新しい機能を有するナノサイズ構造体の創製：
 ナノチューブおよび三次元ホスト分子 / 人工ホスト分子の開発 / 光反応を利用する物質変換化学：
 ヘキサプリズマン誘導体 / 結晶状態における多次元分子配列制御 / 特異な性質を有する新規メタロセン類の合成

主な著書：

1. Solid State Structural Properties of Multibridged [3_n]Cyclophanes and Their Charge Transfer Complexes, M. Yasutake, T. Koga, C. Lim, Z. Ming, T. Shinmyozu, *Cyclophane Chemistry for the 21st Century*, Research Signpost, Kerena, India, pp. 265-300 (2002) (ISBN: 81-7736-082-5).
2. (1) Chapter 22. Photochemical Synthesis of Cage Compounds (pp. 22-1~22-21); (2) Chapter 23. Photochemical Approaches to the Synthesis of [n]Prismanes (pp 23-1~23-11); (3) Chapter 51. Photochemical Synthetic Route to Cyclophanes Involving Decarbonylation Reactions and Related Process (pp 51-1~51-6), T. Shinmyozu, R. Nogita, M. Akita, C. Lim, *CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology*, 2nd edition, CRC Press, USA (2003)(ISBN: 0849313481).
3. 新名主輝男 (分担)「第4版実験化学講座第19巻、有機合成1」、第2章“ヨウ素化合物”, pp. 460-482、丸善、平成4年6月。
4. 新名主輝男 (分担) 高等学校理科用「新編化学I B」、数研出版、平成5年4月。
5. 新名主輝男 (分担) 高等学校理科用「新編化学II B」、数研出版、平成6年4月。
6. 新名主輝男 (分担) 高等学校理科用「新編化学I」、数研出版、平成15年4月。



[3_n]シクロファン類 (n=2-6) をご使用になりたい方は御連絡ください。

お問合せ先：同仁化学研究所 担当 齊藤

E-mail:motoko@dojindo.co.jp

ライブセルイメージング技術講座

1

～ overview ～

(浜松医科大学・21世紀COEプログラム
「メディカルホトニクス」の活動として掲載)



櫻井 孝司
(Takashi Sakurai)
浜松医科大学光量子医学研究センター

1. はじめに

ライフサイエンス研究においてバイオイメージング技術は重要な役割を果たしている。本方法は「光を用いて生体活動を直接見る」とあり、その具体例は「ビデオ顕微鏡を用いた生細胞応答のリアルタイム測定」である。本稿では、光学顕微鏡技術とビデオ画像処理技術の融合による生体機能のダイナミクス解析法「ライブセルイメージング技術」と表し、方法論を中心に解説する。連載にあたり、重要と思われるイメージング手法を選び、技術要素や応用例を掲載していく。「ライブセルイメージングの基本プロトコル」、「測定システムの自力チューニング」や「イメージング法でどこまでわかるか」について、実践的に役立つ内容となるようにしたい。

2. ライブセルイメージングの流れ

これまで光学顕微鏡を中心に、イメージング技術要素の性能向上がなされてきた。性能アップの目的は最終的に得られる画質（SN比やコントラスト）改善であり、研究の目標は“これまで他の方法で不明瞭だったものを一目瞭然にする”ことである。顕微鏡は「よく見えるようにするため」に必須な道具として使用されてきている。この顕微鏡の基本構成やフィルムへの記録などは19世紀に発明された技術である。言い換えると、観測者には動いて見えていた像が静止画でしか記録できなかった。「本来の動きを正確に記録する」というブレクスルーは、1960年代になって活動写真（映画）技術を組み合わせることが端緒となった。顕微鏡像の連続記録技術はテレビ技術の台頭に伴い実用化されるようになった。すなわち、ビデオ画像処理を用いて、映像信号を増幅することで肉眼では不明瞭だった像でも、モニター上では鮮明な拡大画像として観察できるようになった。こうしたビデオ画像処理技術と光学顕微鏡技術の融合によりビデオマイクロコピー法が1980年代に確立すると、イメージングによる細胞の機能解析が研究手法として事実上一般化した。1990年代になると、生物顕微鏡法の理論的な検出限界を超える手法が続々と登場し、マイクロコピーからナノコピーへの移行、または多次元化が進んだ。21世紀の近年に技術要素のデジタル化が進み、小型化・高速化・多チャンネル化したイメージング素子が短周期で登場するようになってきている。総じて「より早く・より小さく・より明るく」という流れがあり、また「より長く・より多面的に・より非侵襲的に」という要求も伴うようになってきている。

3. リアルタイム細胞イメージング

イメージング実験を行う段階において、実験者は「どのくらいの速度で（時間分解能）」で「どの程度の大きさ（空間分解能）」を取り扱うかを最初に計画することになる。測定速度の基準はリアルタイムとなるであろうが、その明確な定義というものは実はない。筆者の独断によれば、現在のイメージング研究におけるリアルタイムとは、実験者がビデオモニター上の画像を滑らかに動いていると知覚できる速さ（ファイ現象）すなわち毎秒17枚以上（60 ms/フレーム）の時間分解能をさす。実際はビデオ信号の転送レート（33 ms/フレーム）がリアルタイムの速度基準として取り扱われている。次に、空間分解能の初期目標値は200 nmとなる。この数値は可視光をレンズで集光させた場合の解像限界値（アッペ・レイリーの定義）をさす。直径200 nm以下の物体を見ようとしても、像は不明瞭でボケ、2つ以上隣接していても個々の区別は困難である。以上のような実情から、毎秒30枚程度の時間分解能と、200 nmの空間分解能（拡大倍率は2千倍程度）の性能までが比較的手軽に達成できる性能といえる。しかも、これだけで細胞のシグナル伝達、形態変化、細胞間相互作用など、大部分の機能を解析することができる。

4. ライブセルイメージングの要素

イメージングシステムの一般的な性能には、3次元空間に時間・光波長・光輝度を加えた6次元的な指標がある。そして、実際の実験系における性能は、主に3要素（デバイス、測定対象、標識）の組み合わせから決定される。

4.1 要素1 イメージングデバイス

4.1.1 IT産業との関連

イメージングシステムは光源 レンズ 検出 記録の4部構成からなる。基本構成や流れだけなら類似した装置が非バイオ用にも多く存在する。その身近な例はDVD記録再生機やコピー機であり、半導体に代表されるIT産業と密接な関係がある。利用される光の波長帯域（紫外光や可視光）などは分野を超えた汎用要素であり、安価で高性能な光学素子の開発が進んでいる。“バイオイメージング分野発”の代表的技術としては共焦点レーザー走査式顕微鏡法がある。

4.1.2 デバイスと性能の関係

光源はランプの輝線が通常は用いられる。固体レーザーの汎用

化により、高輝度化や高分解能化が達成しやすくなっている。レンズにより、光走査・像変換・結像が行われ、照明様式・画像の形成速度・空間分解能がきまる。像の検出には0から3次元的な方法がある。ビデオカメラにより2次元検出がなされ、検出部の感度や画像転送速度により信号SNや時間分解能がきまる。フォトンレベルの超微弱光を低ノイズ超ビデオレートで測定する方法が実用化しつつある。ビデオ信号のデジタル記録は磁気または光ディスク上となり、画像容量と転送様式で記録速度がきまる。このように多くの優れた要素技術が存在しているが、まだ発展途上と思われる技術の1つに色の分解と再現がある。例えば、接眼レンズを通して見た自然色とビデオモニター上の映像を一致させることは困難である。誘電体膜技術や液晶技術の進歩に伴い、高忠実度マルチカラーイメージング法の発展が期待されている。

4.2 要素2 イメージング対象

4.2.1 分子・オルガネライメージング

対象は直径数十nmのナノ粒子から1ミクロンの細胞小器官となる(Fig. 1)。標識化半導体ナノ粒子、標識化金コロイド、神経伝達物質、イオンチャンネル、受容体、DNA、水解酵素、分泌小胞、ミトコンドリアなどが測定されている。これらの対象を測定する場合、その単体は通常直径200nm以上のスポット(粒子)像と

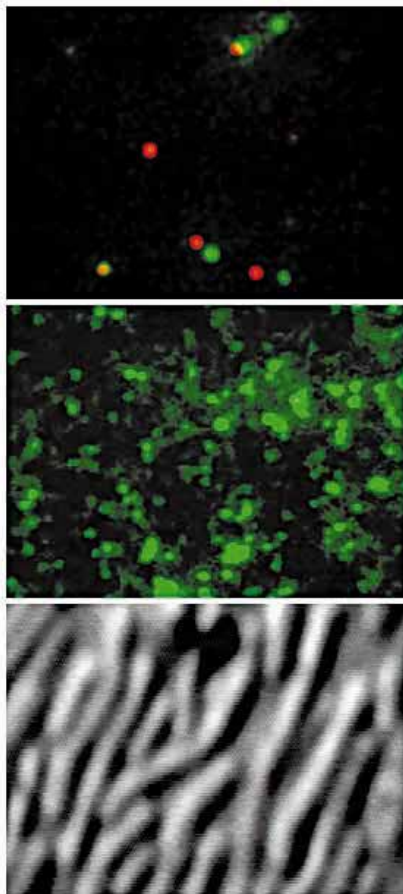


Fig.1 Molecular-imaging
top) Quantum dots (525 & 605, streptavidin conjugates), center) Rhod 2 (150 nm Ca²⁺), bottom) mitochondria

して観察される。粒子像の明るさは相対的に暗く、一方で高速追跡が要求される。全反射照明法や共焦点走査法が適用されている。

4.2.2 細胞・細胞群イメージング

対象は1ミクロン程度の細胞一部領域から数十ミクロンの細胞全体や細胞群となる(Fig. 2)。細胞質領域における信号伝達、分泌、形態変化、分裂、融合、貪食などが測定されている。透過照明法(微分干渉顕微鏡法など)や反射照明法(蛍光顕微鏡)のほとんどが適用できる。リアルタイム細胞イメージング法においてもっとも一般的な測定対象である。

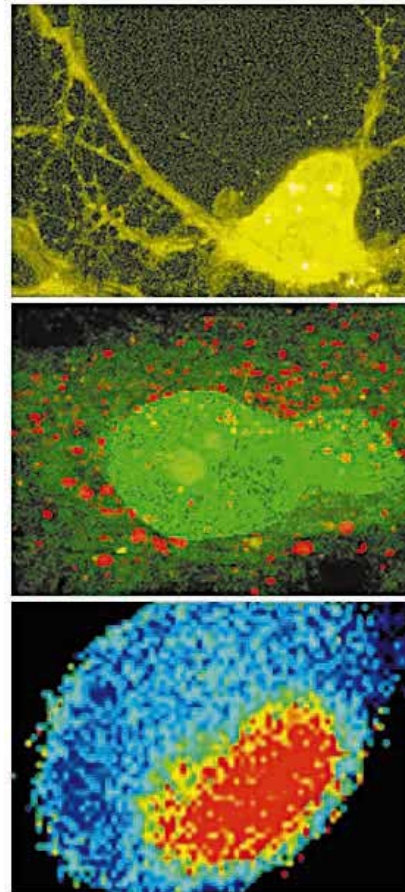


Fig. 2 Cellular-imaging
top) Hippocampal neuron (caged fluorescein maleimide), center) Astrocyte (acridine orange), bottom) Pancreatic β cell (Fluo 3)

4.2.3 組織・生体イメージング

対象は数十ミクロン以上の組織から個体レベルまでとなる(Fig. 3)。できるだけ *In situ* に近い条件で細胞機能を解析する目的で、スライスや血流を維持した臓器全体が取り扱われ、観察時間は数時間から数日に及ぶ。厚みのある対象の深部を観察することが多いため、光透過性や光アプローチの効率を向上させる工夫が必要である。一般には反射照明法全般が用いられ、中でも多光子励起法が威力を発揮している。

4.3 要素3 ライブセルの標識・維持

実際の実験において、見やすく安定した標本を作製することにかかなりの時間を費やすことになる。標本調製で最も重要なこと

は、目的の対象や現象だけを強調（標識）する事である。標識物の代表は蛍光色素や蛍光タンパク質になり（詳しくは成書を参照いただきたい）何を選択するかで測定条件から最終的な性能まで決まってくる。標識と同様に重要なことは、測定中における標本の維持操作である。細胞を標識した直後から細胞は何かしら影響を受けるか、機能が低下し始める。従って、再現性の高い測定を行うために、細胞の機能低下を抑えて、できるだけ長時間にわたり正常状態を維持する注意を払うべきである。工夫として保温、溶液の交換、試薬の添加など行われているが、これらの操作が光照明や像形成に無影響となるように十分な検討が必要である。

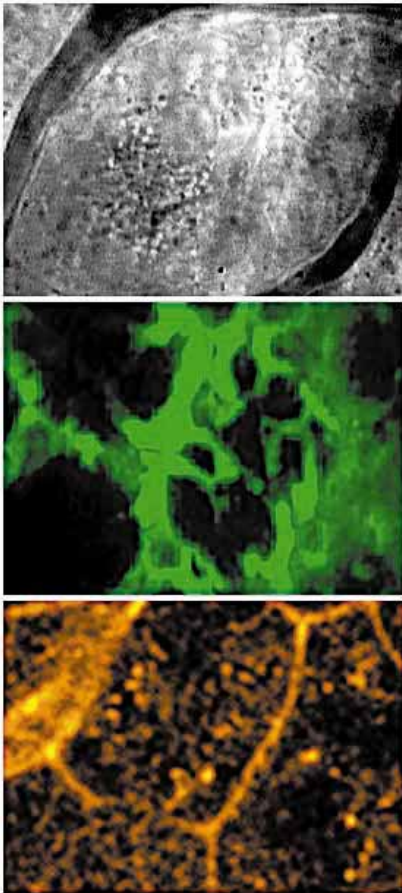


Fig. 3 Intravital-imaging
top) Pancreatic acinar cells, center) Alveolar microcirculation (FITC-BSA), bottom) Adrenal chromaffin cells (FM1-43)

5. 終わりに

今回はライブセルイメージングの流れや技術要素の概要について、空間・時間・色などの代表的な性能に重点をおいて解説した。標本と測定条件を整えさえすれば、あとは高コントラスト画像を得る努力をするだけである。ところが、仮に「何かが見えた」としても、それだけではデータとしては未完成であり、同定、数値化、定量化を経て始めて“生きたデータ”となる。“画像や動画に息を吹き込むこと”ができるか否かは、研究者自身の創意工夫に

依存しているし、これこそイメージング実験独特の醍醐味である。実験系の改良が発見や技術開発に結びつくのは言うまでもない。本連載が、新しいイメージング装置、標識プローブや定量解析法への開発へと発展するきっかけとなれば幸いである。

6. 参考資料

今回はイメージングデバイスや蛍光プローブについて技術的に参考となる著作物をあげる。具体的な文献については次回以降に紹介する。

- 1) 第12回浜松医科大学メディカルホトニクスコーステキスト
- 2) 第12回日本バイオイメーjing学会学術集会要旨集
- 3) 新しい光学顕微鏡 学際企画
- 4) バイオイメーjingの最先端 先端医療技術研究所
- 5) ビデオ顕微鏡 共立出版
- 6) バイオイメーjingでここまで理解 羊土社
- 7) 光通信技術ハンドブック オプトロニクス社
- 8) 最新光学技術ハンドブック 朝倉書店
- 9) Optics, 4th ed., Addison-Wesley, 2001
- 10) Television engineering handbook, Rev. ed., McGraw Hill
- 11) The image processing handbook, CRC, 2002
- 12) Handbook of fluorescent probes and research products, 9th ed, Molecular Probes
- 13) 同仁化学研究所 第24版総合カタログ

著者紹介

氏名：櫻井 孝司 (Takashi Sakurai)
年齢：36歳
所属：浜松医科大学光量子医学研究センター
細胞イメージング研究分野

連絡先：〒431-3192 浜松市半田山 1-20-1
TEL & FAX:053-435-2392

E-mail: takker@hama-med.ac.jp

出身学校：総合研究大学院大学生理学専攻

学位：学術博士

現在の研究テーマ：

次世代近接場走査型顕微鏡の開発（文部科学省・浜松地域知的クラスター創生事業）

細胞内信号分子、神経伝達物質やホルモン放出機構のイメージ解析
生体内共焦点顕微鏡法および脳機能の *in situ* 評価法の開発（浜松医科大学・21世紀COEプログラム）

主な著書：

FLIP法によるシナプス機能の微小操作，*脳の科学*，**22**，1119(2000).

膵臓ランゲルハンス島における化学発光法によるスーパーオキシドの検出，*Ultrastructure and Molecular Biology Protocols*，205(2001).

趣味：旅行、動画編集

Topics on Chemistry

cDNA から作成する RNAi ライブラリ

(株) 同仁化学研究所 渡辺 栄治

RNA 干渉(RNAi)は、細胞に導入された 2 本鎖 RNA が、それと同じ配列を持つ遺伝子の発現を抑制する現象のことである。この方法は、標的遺伝子(mRNA)を破壊することで発現を抑制する為、遺伝子の機能解析に有効な方法として近年急速に注目されている。哺乳動物細胞では、30bp 以上の長い 2 本鎖 RNA が導入されると抗ウイルス応答により非特異的抑制を引き起こし、アポトーシスを誘発するが、短い RNA では単一のタンパク質の発現のみが特異的に抑制制御される。特異的発現抑制制御をする最も有効な RNA 長は 21mer で、3' 末端に 2 塩基がオーバーハングした dsRNA であると報告されている。このような 20mer 前後の短い 2 本鎖の RNA は small interfering RNA (siRNA) と呼ばれている。また、ヘアピン構造に折り畳んだ小さな RNA(short hairpin RNA (shRNA)) も siRNA と同様に遺伝子の発現を抑制することが知られている。

最近、cDNA を酵素的に処理して shRNA 発現ベクターのライブラリを作成する方法が相次いで報告された。Shirane らは Enzymatic production of RNAi library (EPRIL) と呼ぶ方法を報告している¹⁾。EPRIL は、1) DNase I による cDNA のランダムな断片化、2) 認識部位の約 20 塩基先を切断する制限酵素 MmeI の認識部位を含むヘアピン型アダプターのライゲーション、3) MmeI 消化による 1 本鎖ヘアピン DNA の作成、4) セカンドアダプターのライゲーション、5) ポリメラーゼ反応による 2 本鎖 DNA の作成、6) プラスミドベクターへの挿入といったステップからなる(図 1)。導入された DNA はセンス部、ループ部、アンチセンス部を含んでおり、発現する RNA はループ部で折りたたまれた shRNAs となる。センス部、アンチセンス部は cDNA のランダムな断片に由来しているため、多種の配列を含む shRNAs を一度に得ることができる。Shirane らは GFP と type 1 inositol 1,4,5-triphosphate receptor (IP₃R) の cDNA から shRNA 発現ベクターのライブラリを作成し、本手法の有用性を確認している。

Luo らは Small interfering RNA Production by Enzymatic Engineering of DNA (SPEED) と呼ぶ方法を報告している²⁾。SPEED では cDNA の断片化に数種類の制限酵素を用い、その後、EPRIL と同様の方法で shRNA 発現ベクターのライブラリを作成する。SPEED では一般的に、~ 2000bp の cDNA から ~ 100 個の異なる shRNA クローンが得られる。

選択した siRNA 配列であっても効果を有するものは僅かであり、通常、ターゲット遺伝子ごとに複数の合成 siRNA を作り、テストする必要がある。本稿で紹介した RNAi ライブラリ作成法を用いれば、機能が分かっているかないにかかわらず、すべての遺伝子で活性のある shRNA を選択することが可能である。

参考文献

- 1) D. Shirane, K. Sugao, S. Namaki, M. Tanabe, M. Iino and K. Hirose, *Nat., Genet.*, **36** (2), 190 (2004).
- 2) B. Luo, A. D. Heard and H. F. Lodish, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 5494 (2004).

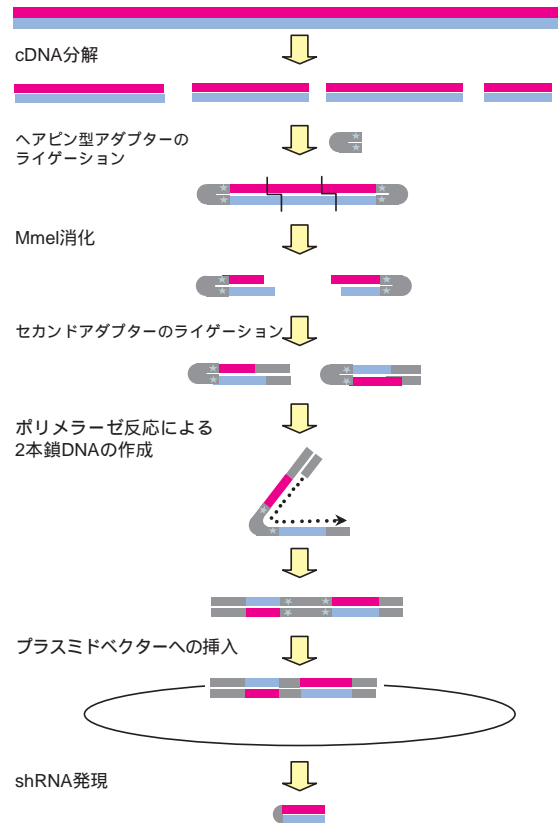


図 1. EPRIL のアウトライン

第 15 回フォーラム・イン・ドージン開催のご案内

日時：平成 16 年 11 月 26 日（金）9:30 ~ 17:30
 場所：鶴屋ホール（熊本市手取本町 8-9 テトリア熊本 7F）
 テーマ：「ウイルス - 飛び回る遺伝子 - の分子病理学」
 演者予定（敬称略）

- 林 哲也（宮崎大学フロンティア科学実験総合センター）
- 原田 信志（熊本大学大学院医学薬学研究部）
- 増田 貴夫（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科）
- 岡本 尚（名古屋市立大学大学院医学研究科）
- 藤井 雅寛（新潟大学大学院医歯学総合研究科）
- 櫻木 淳一（大阪大学微生物病研究所）
- 馬場 昌範（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
附属難治ウイルス病態制御研究センター）
- 岩本 愛吉（東京大学医科学研究所
附属病院先端医療研究センター）

詳細は次号にてご案内いたしますので、ご期待ください。

お問い合わせ先：フォーラム・イン・ドージン事務局

（担当 蒲野、堀口）

E-mail : komine@dojindo.co.jp

または d-hori@dojindo.co.jp

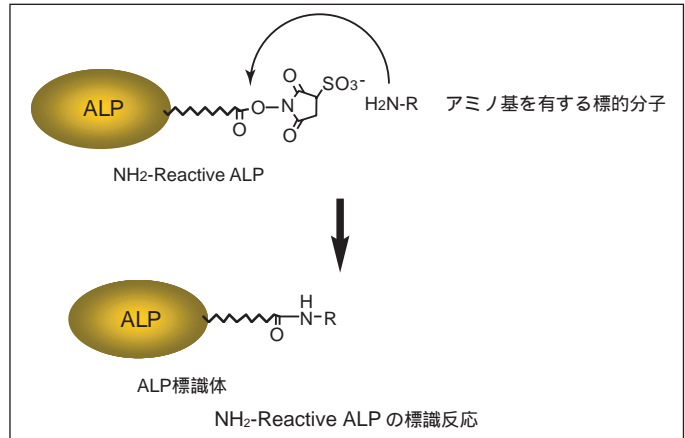
TEL : 0120-489548 FAX : 0120-021557

試作品

アルカリホスファターゼ標識用キット

アルカリホスファターゼ(ALP)は、ペルオキシダーゼと並び、酵素免疫法に利用される最も一般的な酵素です。化学発光を利用した検出法は、エンザイム免疫アッセイ(EIA)を始め、非放射性分析法としてウェスタンブロットングや組織染色に広く利用されています。

Alkaline Phosphatase Labeling Kits は、アミノ基あるいはSH基を有する分子にALPを標識するためのキットで、キット付属のReactive ALPと標的分子を混合するだけで簡単にALP標識体を得ることができます。イムノグロブリンG (IgG)にALPを標識する場合、必要なIgGの量は50 ~ 200 µgで、少量の標識体を調製するのに最適です。IgGだけではなく、Fab'への標識、また、低分子化合物への標識も可能であり、広範な標識用途に利用できます。



Alkaline Phosphatase Labeling Kit-NH₂

<特長>

3時間以内にアルカリホスファターゼ標識体が調製できる。

高分子化合物 (MW>50,000) および低分子化合物 (MW<5,000) を標識できる。

NH₂-Reactive ALP と混合するだけでアルカリホスファターゼ標識体を形成する。

Filtration Tube を用いた分離操作により高い回収率で標識体を得られる。

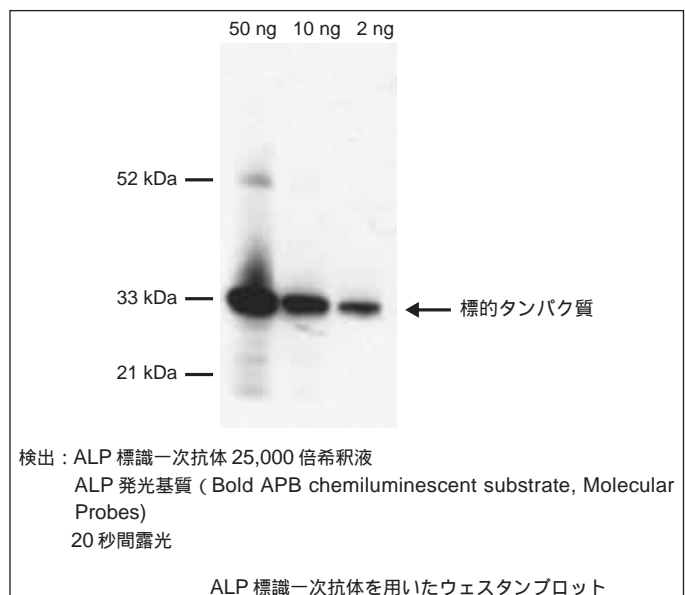
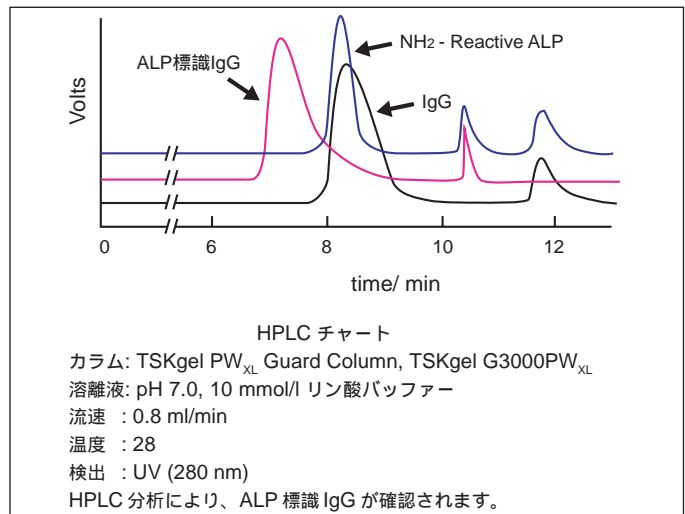
付属の保存溶液でALP標識体の長期保存ができる。

<キット内容> 3サンプル標識用

NH ₂ -Reactive ALP	100 µg × 3本
Washing Buffer	4 ml × 1本
Reaction Buffer	200 µl × 1本
Storage Buffer	4 ml × 1本
Filtration Tube	3本

Alkaline Phosphatase Labeling Kit-NH₂ は、アミノ基を有する分子にALPを標識するためのキットです。NH₂-Reactive ALP は、活性エステル基を導入したALPです。アミノ基を有する標的分子と混合するだけで安定な共有結合を形成します。IgGのような高分子タンパクをサンプルに使用する場合、付属のFiltration Tube を用いて簡単にサンプルの前処理を行うことができます。ALP活性や標識反応を阻害するような低分子化合物(リン酸やTrisなど)は、Filtration Tube を用いた前処理によって除去されるため、透析やゲルろ過などの処理を行う必要がありません。また、本キットを用いて低分子化合物を標識する場合、未反応の低分子化合物は付属のFiltration Tubeを用いた精製操作により除去されるため、高純度の標識体を得ることができます。

本キットには標識に必要なすべての試薬と作製したALP標識体を保存するための溶液が含まれています。



Alkaline Phosphatase Labeling Kit-SH

<特長>

- 3時間以内にアルカリホスファターゼ標識体が調製できる。
- 高分子化合物 (MW>50,000) および低分子化合物 (MW<5,000) を標識できる。
- SH-Reactive ALPと混合するだけでアルカリホスファターゼ標識体を形成する。
- 付属の還元剤を用いることで遊離SH基を持たないタンパク質への標識も可能*。
- Filtration Tube を用いた分離操作により高い回収率で標識体が得られる。
- 付属の保存溶液で ALP 標識体の長期保存ができる。

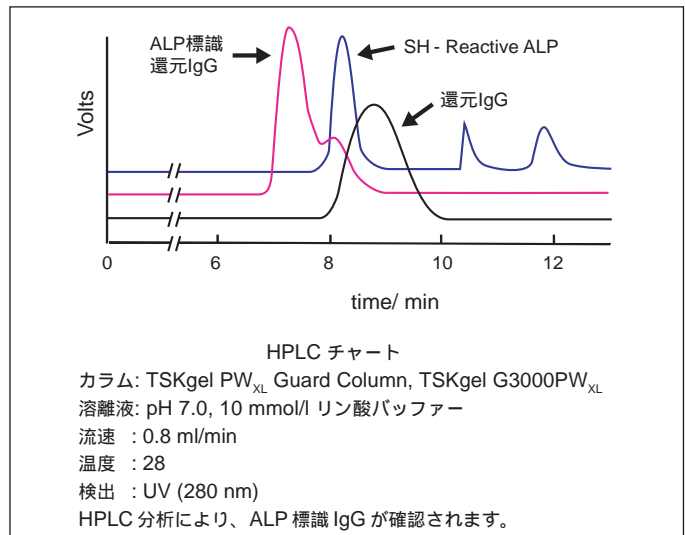
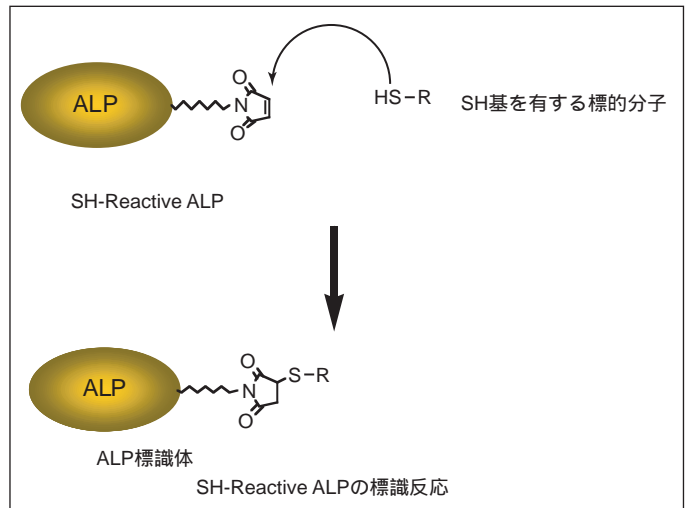
* S-S 結合の切断によってタンパク質の活性が失われる場合があります。

<キット内容> 3 サンプル標識用

SH-Reactive ALP	100 µg × 3 本
Reducing Agent	80 µg × 3 本
Solution A	4 ml × 1 本
Solution B	1 ml × 1 本
Reaction Buffer	200 µl × 1 本
Storage Buffer	4 ml × 1 本
Filtration Tube	3 本

Alkaline Phosphatase Labeling Kit-SH は、SH 基を有する分子に ALP を標識するためのキットです。SH-Reactive ALP は、マレイミド基を導入した ALP です。SH 基を有する標的分子と混合するだけで安定な共有結合を形成します。標的タンパク質が SH 基を持っていない場合には、付属の還元剤を用いて遊離 SH 基を調製することが可能です(ただし、S-S 結合の切断によってタンパク質の活性が失われる場合があります)。IgG ヒンジ領域の SH 基を標識に利用すれば、抗体活性を損なわずに ALP を標識することができます。

IgG のような高分子タンパクをサンプルに使用する場合、付属の Filtration Tube を用いることで簡単にサンプルの前処理を行うことができます。ALP 活性を阻害するような低分子化合物(リン酸など)は、Filtration Tube を用いた前処理によって除去されるため、透析やゲルろ過などの処理を行う必要がありません。また、本キットを用いて低分子化合物を標識する場合、未反応の低分子化合物は付属の Filtration Tube を用いた精製操作により除去されるため、高純度の標識体を得ることができます。本キットには標識に必要なすべての試薬と作製した ALP 標識体を保存するための溶液が含まれています。



Q & A

ペルオキシダーゼ標識用キット

Peroxidase Labeling Kit-NH₂ Peroxidase Labeling Kit-SH

これらのキットは目的とする化合物にペルオキシダーゼを標識するためのものです。1次抗体に直接ペルオキシダーゼを標識する方法は、操作が煩雑で時間もかかるものが多く、ほとんどは2次抗体にペルオキシダーゼ標識した市販品を使用し目的物の検出が行われます。

しかし、本キットを用いることにより、目的の化合物に簡便かつ短時間でペルオキシダーゼを標識することができ、研究の発展・多様化に役立つものと考えられます。

Q1 キットが2種類ありますが、どちらを選べばよいのでしょうか？

A1 アミノ基を有する化合物内には Peroxidase Labeling Kit-NH₂を、SH基(もしくはS-S)を有するものは Peroxidase Labeling Kit-SHをご使用ください。

Q2 IgG以外のタンパク質にも標識することはできますか？

A2 アミノ基もしくはチオール基を持つタンパク質であれば標識できます。キットによる標識タンパク質の精製の都合上、分子量が50,000以上あるいは5,000以下のものが対象となります。分子量5,000以下の化合物に関しては、製品添付の低分子化合物への標識のプロトコールに従ってください。

Q3 使用できるIgGが少量しかありませんが標識できますか？

A3 使用できるIgGの量は50～200μgとしています。この範囲であれば性能に大きな違いはみられません。10μgのIgGでも標識可能ですが、バックグラウンドの上昇などの問題が生じる可能性があります。

Q4 サンプルは溶液になっていても問題ないでしょうか？

A4 問題ありません。
但し、添付のFiltration Tubeの容量に制限がありますので、サンプル溶液の容量は100μl以下である必要があります。また、サンプル(IgGなど)の濃度が0.5mg/ml以下である場合は、Filtration Tubeを用いてその濃度が50～200μgとなるようにします。

溶液をFiltration Tubeにいれて遠心して溶液を除く操作を行ってください。(必要であれば繰り返す)

フィルター上に残っているサンプル量が50～200μgとなればよいので、改めて溶解させる必要はありません。

Q5 キットの保存期間はどのくらいですか？

A5 冷蔵保存(0～5℃)で6ヶ月(未開封時)安定であることを確認しています。

Q6 それぞれのキットでラベル化後の安定期間はどの程度ですか？

A6 添付のStorage Buffer中に保存した場合、数ヶ月は安定で

す。安定性は使用する抗体に依存します。

Q7 遠心が8,000×g,10minとなっていますが、回転数ももっと少なくてもできますか？

A7 可能です。ただし、回転数を落とす場合は、時間を長くする必要があります。延長する時間はサンプルの状況をみてご判断下さい。

Q8 SHラベルのキットはS-S基を含む低分子化合物に対しても使用できますか？

A8 残念ながら、このキットではできません。S-S基をSH基に還元するためのReducing Agentと低分子化合物の分離ができないためです。還元したものを別にご用意ください。

Q9 添付の保存バッファーでなくともラベル化物の保存はできますか？

A9 可能です。実験系によりご希望のバッファーに溶解し保存してください。

Q10 免疫染色やプロットングの例はありますか？
ない場合は、可能ですか？

A10 ウェスタンプロットングに使用しており、使用可能であることを確認しております。免疫染色に関しては使用は可能であると思われませんが、現段階ではデータはありません。

Q11 IgGに対してどれくらいのPeroxidaseが標識されますか？

A11 NH₂-Reactive Peroxidaseでは、IgG 1分子に対して平均1～3分子、SH-Reactive Peroxidaseでは、還元IgG 1分子に対して平均1～2分子です。未反応のPeroxidaseは通常のエンザイムアッセイには影響を及ぼしません。精製が必要な場合は、ゲルろ過カラムまたはアフィニティークラムにより精製を行ってください。

Q12 Filtration Tubeのサイズはどのくらいですか？

A12 30Kのサイズのものを使用しております。

仕様変更のお知らせ

Peroxidase Labeling kit-SHに含まれるReducing Agentの容量を変更しました。

従来：400μg/tube 新：80μg/tube

尚、キットの使用方法に変更はありません。

品名	容量	本体価格(¥)	メーカーコード
Peroxidase Labeling Kit-NH ₂	3 samples	17,000	LK11
Peroxidase Labeling Kit-SH	3 samples	17,000	LK09

新製品

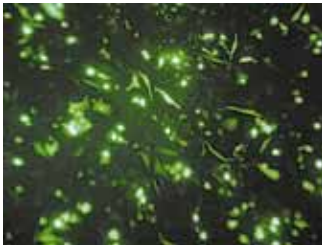
陽イオン性脂質遺伝子導入試薬

-DoFect- GT1

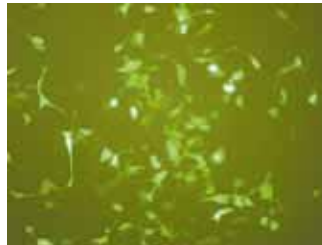
< 特長 >

高い導入効率・低い細胞毒性
 神経細胞、初代培養細胞にも適応
 非ウイルス性・非動物性なので安全
 簡便かつ迅速な操作性
 血清を含む培地にも適応
 低価格を実現

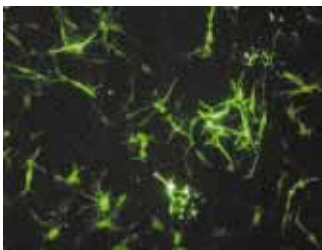
< GFP 遺伝子導入例 >



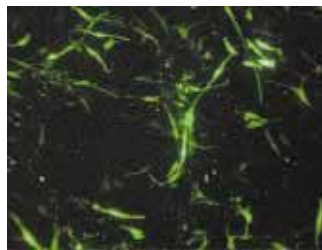
HeLa 細胞(ヒト子宮頸癌細胞)



SFME(マウス胎児神経幹細胞)



FGF2 依存性神経細胞



EGF 依存性神経細胞

下段写真は共にマウス胎児中枢神経系細胞

図1 hsGFP 遺伝子発現ベクターをトランスフェクションし、1日後に蛍光顕微鏡で観察しました。

< 導入実績のある細胞種 >

HeLa(ヒト子宮頸癌)、293(ヒト腎臓)、MRC5(ヒト胎児正常肺)、UtSMC(ヒト正常子宮平滑筋)、A549(ヒト肺癌)、HepG2(ヒト肝臓癌)、Caco2(ヒト大腸癌)、MG63(ヒト骨肉腫)、Jurkat(ヒトT細胞性白血病)、Molt4(ヒトT細胞性白血病)、K562(ヒト慢性骨髄性白血病)、U937(ヒト単球性白血病)、A172(ヒト神経膠芽腫)、PA1(ヒト卵巣性テラトカルシノーマ)、MCF7(ヒト乳癌)、PC12(ラット褐色細胞腫)、CHO(ハムスター卵巣)、COS7(サル腎臓)、Vero(サル腎臓)、NIH/3T3(マウス胎児繊維芽細胞)、SFME(マウス胎児正常神経幹細胞)、ES-D3(マウス胚性幹細胞)、STO(マウス胚細胞: ES細胞用フィーダー細胞)

-DoFect- GT1は、合成陽イオン性脂質を使用した遺伝子導入試薬です。合成脂質であるため、トランスフェクション後の生成タンパク質等には、他の病原体などの混入が無く、安全に使用することができます。DNA と脂質の複合体は短時間に形成されるため、簡便・迅速にトランスフェクションを行う事ができます。一般に汎用されている培養細胞に対して高い導入効率でトランスフェクションが可能であり、神経細胞・初代培養細胞にも適応できます。また、血清含有培地でのトランスフェクションも可能です。

< 導入操作方法 >

35-mm Dish (1Dish の細胞密度 50-70%)を用いた場合

1. 1.5 ml サンプルチューブに1Dish に対して無血清培地 25 μ l、DNA 1.0-4.0 μ g、よく攪拌・懸濁させた -DoFect- GT1 3.0-12.0 μ l を順に加え、ゆっくりピペティングし、5分間インキュベートする。

様々な培地(MEM、DMEM、F-12、RPMI1640 等)に適応できます。また、抗生物質を除いた培地を用いる必要はありません。

DNA/GT1複合体は複合体形成後100分まで安定であることが確認されています。

2. 前日から細胞を播種しておいた各 Dish の増殖用培地を除き、1Dish に対して1 ml の無血清培地に交換する。

無血清培地でのトランスフェクションを推奨しますが、血清含有培地(0-10%)でも導入することが出来ます。

細胞を培地で洗う必要はありません。

3. 各 Dish に1. で作成した溶液を添加し、軽くゆすって振盪させ全体にいきわたらせる。

4. トランスフェクション4-6時間後、培地を交換または目的の血清濃度になるよう血清含有培地を添加する。

血清存在下での導入の場合、培地交換の必要はありません。

5. 一過性の発現を評価する場合は、トランスフェクション16 72時間後にレポーター遺伝子の活性を測定する。

6. 安定発現を評価する場合は、トランスフェクション16 72時間後に細胞を回収し、選択薬剤を含む培養液中で培養する。1 2週間培養後、目的遺伝子を発現している細胞の測定を行う。

注意事項 -DoFect- GT1 は懸濁液です。

よく振り混ぜて、必ず懸濁状態でご使用ください。

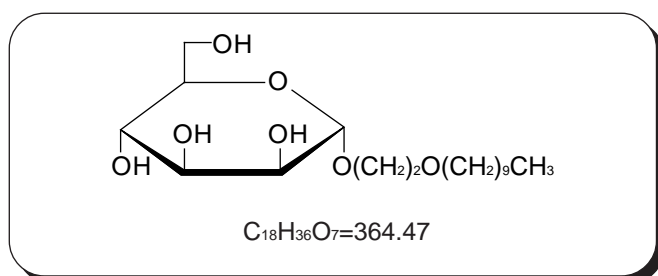
品名	容量	本体価格(¥)	メーカーコード
-Do Fect- GT1	1.5 ml	25,000	DF01

新製品

膜タンパク質可溶化剤

3-Oxatriidecyl- α -D-mannoside

化学名 3-Oxatriidecyl- α -D-mannopyranoside



3-Oxatriidecyl- α -D-mannoside は、親水部としてマンノースを、疎水部としてエーテル結合を含むアルキル鎖を有する非イオン性界面活性剤です。cmc は 0.63 mmol/l です。

膜タンパク結晶化剤として知られている、*n*-Decyl- β -D-maltoside、*n*-Dodecyl- β -D-maltoside などと同様に膜タンパクの結晶化に有用な界面活性剤です。姫路工業大学の吉川らは、3-Oxatriidecyl- α -D-mannoside を用いてウシ心筋チトクロムc酸化酵素の単量体結晶を作成し、2.0 の分解能を持つX線回折像を得ています。今後、種々の膜タンパク質の結晶化、機能解析への応用が期待されます。

品名	容量	本体価格(¥)	メーカーコード
3-Oxatriidecyl- α -D-mannoside	500 mg	16,000	O401

関連商品

品名	容量	本体価格(¥)	コード	メーカーコード
<i>n</i> -Decyl- β -D-maltoside	1 g	10,800	349-08041	D382
	5 g	42,000	345-08043	D382
<i>n</i> -Dodecyl- β -D-maltoside	1 g	13,000	341-06161	D316
	5 g	52,000	347-06163	D316
<i>n</i> -Octyl- β -D-glucoside	250 mg	3,600	340-05031	O001
	1 g	7,200	346-05033	O001
	5 g	26,000	344-05034	O001

お知らせ

残留塩素測定キット色調比色計改良

残留塩素測定キット -SBT 法

残留塩素測定キット -SBT 法は、温度による測定誤差を少なくするために、検水の温度にあわせて色調比色板2枚(標準用と高温用)を差し替えて、測定します。

これまでは差し替えのために、1)色調比色計を分解 2)色調比色板をつけかえ 3)色調比色計の組み立ての3工程が必要でした。このたび、1)および3)の工程が不要となる改良を加え、色調比色板のつけかえを「より簡単、迅速、安全に」行うことが可能となりました。

より一層のご愛顧を賜りますようお願いいたします。

色調比色板差し替え手順

1



2

(上方向から見たところ)



(横方向から見たところ)



- 標準色調比色板を の方向へ引っ張って、比色計から取り外す。
- 高温用色調比色板を の方向へ、比色計の溝にカチッと音がして固定されるまで差し込む。

品名	容量	本体価格(¥)	メーカーコード
残留塩素測定キット -SBT 法	set	7,000	ZK01-50
残留塩素測定試薬 -SBT 法	100 回用	1,300	ZK01-60
	" 500 回用	5,000	ZK01-60
色素液	100 ml	9,000	ZK01-70
検水調整液	200 ml	5,000	ZK01-80

ホームページアドレス

URL : [http:// www.dojindo.co.jp/](http://www.dojindo.co.jp/)
E-mail : info@dojindo.co.jp

フリーファックス 0120-021557
フリーダイヤル 0120-489548