

化学物質のエストロゲン様作用評価のための 蛍光標識エストロゲンの合成

The synthesis of an estrogen derivative bearing a fluorochrome for quantitative analyses of estrogen agonist activity of several chemicals

桐原 正之*、今井 暁彦**、緒方 智美***、石塚 勇貴***

Masayuki KIRIHARA, Akihiko IMAI, Tomomi OGATA and Yuki ISHIZUKA

Abstract: An estradiol derivatives having a fluorochrome at its C-17 position was synthesized to develop a fluorescent indicator for quantitative analyses of estrogen agonist activity of several compounds. The reaction of 3-azidodansylpropylamine with ethynylestradiol in the presence of catalytic amounts of copper sulfate and sodium ascorbate produced the desired estrogen derivatives bearing a fluorochrome in 40% yield.

1. はじめに

エストロゲンとはステロイドホルモンの一種で、一般的にエストロン、エストラジオール、エストリオールの3種類があり、ステロイド骨格を有している (Fig. 1)。これらはエストロゲン受容体と結合し、女性ホルモンとして働く。¹



エストロゲン以外にもエストロゲン受容体と結合し、女性ホルモン作用を示す物質がある。これらの物質のように、各種ホルモン受容体と結合して、間違っただけの情報を送ることにより、生体内で攪乱作用をおこす化合物は、内分泌攪乱物質 (環境ホルモン) と呼ばれている。² 内分泌攪乱作用を持っているのではないかと疑われている物質は、多数あり、それらの構造式からだけでは、内分泌攪乱作用 (エストロゲン様作用) の有無を判断するのは困難である。²

そこで我々は、各種化学物質がエストロゲン様作用を有するかどうかを、簡便に分析するための手法の開発を行うことにした。

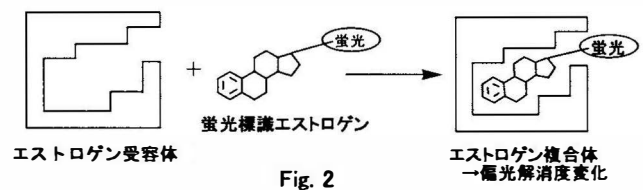
2. 分析法の原理

化学物質がエストロゲン様作用をひきおこすためには、まずエストロゲン受容体と結合する必要がある。そこで、

ある化学物質がどの程度エストロゲン受容体と結合することができるかを定量分析することができれば、エストロゲン様作用の有無も推測できる。

我々は、エストロゲン受容体に対する、蛍光標識エストロゲン誘導体と、エストロゲン様作用の有無を調べたい物質との競合的結合実験を行えば、分析したい化合物のエストロゲン受容体への結合能力の強さを調べることができるのではないかと考えた。分析原理の詳細を以下に述べる。

エストロゲン受容体に対して、蛍光標識エストロゲンと作用させると、受容体に蛍光標識エストロゲン分子が取り込まれて結合する。この場合、蛍光標識エストロゲン誘導体分子の分子運動の自由度が減るため、偏光解消度が変化すると考えられる (Fig. 2)。



しかし、エストロゲン様作用を持つ物質 (内分泌攪乱物質) と蛍光標識エストロゲンが共存していると、一部の受容体には内分泌攪乱物質が先に結合するため、蛍光標識エストロゲンは結合することができず、偏光解消度の変化の度合いが低下する (Fig. 3)。

そこで、エストロゲン様作用評価したい化合物の非存在下および存在下に、蛍光標識エストロゲンをエストロゲン受容体に作用させて偏光解消度を比べれば、その物質のエ

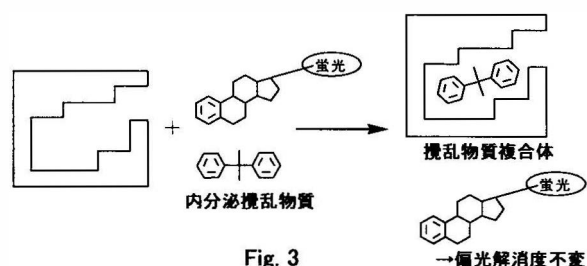
2012年3月1日受理

* 理工学部 物質生命科学科

** 理工学部 物質生命科学科 4年生

*** 大学院理工学研究科 大学院生

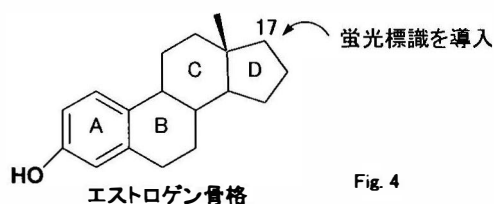
ストロゲン様作用の強さを定量分析できることになる。



3. 蛍光標識エストロゲン誘導体の合成

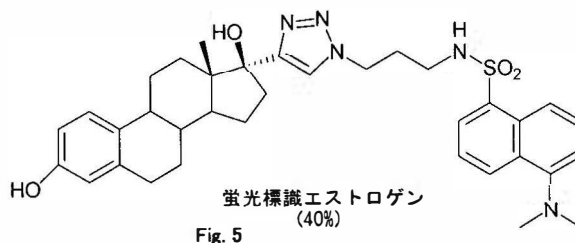
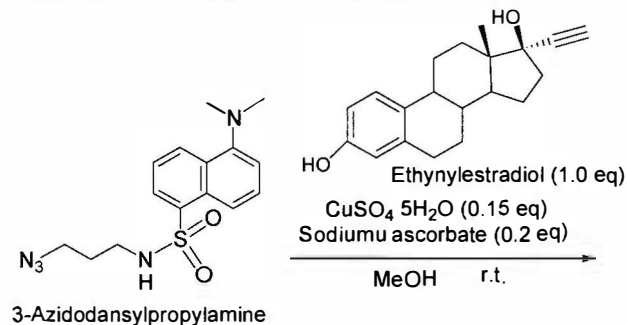
蛍光標識されたエストロゲン誘導体はいくつか合成されている³。しかしながら、それらの合成法はあまり簡便なものではなかった。そこで今回我々は蛍光標識エストロゲン誘導体の簡便合成を計画した。

エストロゲンは、A環部からエストロゲン受容体に進入して結合することがわかっている⁴ので、A環部から最も遠いD環部の17位炭素であれば、蛍光標識を導入しても受容体への結合を妨げることはないと考えた (Fig. 4)。



そこで、エチニルエストラジオール (医薬品として市販されているので入手容易) のアルキン部位と、3-azidodansylpropylamine (市販の蛍光物質である dansyl chloride からの合成法が報告されている⁵) のアジド基部分を、クリックケミストリー (Huisgen 反応)⁶ を用いて結合させることを検討した。

3-Azidodansylpropylamine に対してメタノール中、硫酸銅・5水和物 (0.15 当量) およびアスコルビン酸ナトリウム (0.2 当量) 存在下、エチニルエストラジオール (1.0 当量) を室温下にて反応させると、3-azidodansylpropylamine のアジド基とエチニルエストラジオールのアルキン部位が [3+2] 付加環化することにより、1,2,3 トリアゾール環が生成し、目的の蛍光標識エストロゲンを収率 40% で合成することに成功した (Fig. 5)。



4. まとめ

今回我々は、クリックケミストリーを用いることにより、エストロゲンの D 環部 17 位に蛍光標識を導入した化合物を合成することに成功した。本化合物は各種化学物質のエストロゲン様作用評価に応用されることが期待できる。

5. 実験の部

赤外吸収スペクトル (IR) は JASCO FT/IR-8300 型を用いて測定した。核磁気共鳴スペクトル (NMR) は、JEOL JNM-EX400 または JEOLCX40 核磁気共鳴装置を用い、内部標準物質として、テトラメチルシラン (TMS) を用いて測定した。質量スペクトル (MS) は、島津 GCMS-QP1100EX 質量分析装置を用いて測定した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーは、関東化学 Silica Gel 60N (spherical, neutral) を用いて行った。薄層クロマトグラフィー (TLC) 分析は、メルク(株) TLC アルミニウムシート 20 x 20 cm シリカゲル 60 F254 を用いて行った。

3-Dansyl[4-(3,17-dihydroxy-13-methyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahydro-6H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl)]1,2,3]triazol-1-yl]propylamine (蛍光標識エストロゲン誘導体)

文献⁵に従って合成した 3-azidodansylpropylamine (72.2 mg, 0.2 mmol) を MeOH (10 ml) に溶解し、エチニルエストラジオール (60.1 mg, 0.2 mmol) を加えた。さらに硫酸銅・5水和物 (5.2 mg, 0.04 mmol) とアスコルビン酸ナトリウム (8.5 mg, 0.03 mmol) を加え、室温にて 3 日間反応させた。水 5 ml を加え攪拌し、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を溜去することにより、粗生成物を得た。これをショートカラムクロマトグラフィー [カラム管径 2.5 cm、展開溶媒 (Hexane : EtOAc = 3 : 1 ~ 2 : 1)、シリカゲル (粒径 40-100 μm ; 粒径 40-50 μm = 1 : 1) 12 g] で精製することにより、蛍光標識エストロゲンを無色結晶 (49.8 mg, 40%) として得た。

融点 : 127°C

IR (neat) cm^{-1} : 3020, 1215, 763, 671.

¹H-NMR (CDCl_3) δ : 8.56 (1H, d, J = 5.6 Hz), 8.25 (2H, dd, J = 11.6 and 5 Hz), 7.52 (3H, m), 7.20 (1H, s), 7.17 (1H, d, J =

8.0Hz), 6.64 (2H, dd, $J=11.6$ and 8.0 Hz), 6.56 (1H, d, $J=3.0$ Hz), 4.57 (1H, brs), 4.11 (3H, q, $J=7.0$ Hz), 4.08 (2H, t, $J=7.0$ Hz), 3.27 (2H, t, $J=7.0$ Hz), 2.97 (2H, dd, $J=12.8$ and 6.4 Hz), 2.89 (6H, s), 2.30 (5H, m), 2.06 (1H, s), 1.65 (2H, m), 1.26 (5H, t, $J=7.0$ Hz), 0.93 (3H, t, $J=7.0$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ : 171.23, 153.46, 152.22, 138.34, 134.36, 132.64, 131.86, 130.75, 130.01, 129.95, 129.60, 128.62, 126.65, 123.31, 118.54, 115.36, 115.33, 112.77, 101.24, 87.57, 64.52, 60.56, 45.51, 43.59, 40.91, 39.47, 39.03, 32.80, 30.82, 30.72, 29.71, 28.88, 27.27, 22.89, 14.29, 12.77.

MS (m/z): 271 ($\text{M}^+ - \text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{SO}_2\text{N}_5$), 234 ($\text{M}^+ - \text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{O}_2\text{N}_4$), 124 ($\text{M}^+ - \text{C}_{30}\text{H}_{35}\text{NO}_4\text{S}$).

謝辭

本研究の一部は、平成 22~26 年度文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 (S1001032) の研究費によって支援された。

参考文献

- 1) 秋久俊博, 長田洋子編, *生体分子化学* (共立出版, 東京, 2005).
- 2) 東京都立衛生研究所編, *内分泌かく乱作用が疑われる化学物質の生体影響 データ集* (東京都立衛生研究所, 東京, 1999).
- 3) J. Reine, J. Kool, and N. P. E. Vermeulen, "Reversed-phase liquid chromatography coupled on-line to estrogen receptor bioaffinity detection based on fluorescence polarization" *Anal. Bioanal. Chem.*, **390** (2008) 1987; M. N. Dunkle, J. K. Herrmann, H. Colon, C. Pennington, and L. A. Colon, "Evaluation of a fluorescein-labeled estradiol derivative for use in affinity capillary electrophoresis" *Microchem. J.*, **82** (2006) 100; J. R. Lee, J. Choi, and M. J. Choi, "Fluorescein labeling of estrogen for application of fluorescence polarization binding assays for antibody and receptor" *Microchem. J.*, **70** (2001) 229.
- 4) K.-J. Hwang, K. E. Carlson, G. M. Anstead, and J. A. Katzenellenbogen, "Donor-Acceptor Tetrahydrochrysenes, Inherently Fluorescent, High-Affinity Ligands for the Estrogen Receptor: Binding and Fluorescence Characteristics and Fluorometric Assay of Receptor" *Biochemistry*, **31** (1992) 11536.
- 5) W. G. Lewis, F. G. Magallon, V. V. Fokin, and M. G. Finn, "Discovery and Characterization of Catalysts for Azide-Alkyne Cycloaddition by Fluorescence Quenching", *J. Am. Chem. Soc.*, **126** (2004) 9152.
- 6) H. C. Kolb, M. G. Finn, and K. B. Sharpless, "Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40** (2001) 2004; V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, and K. B. Sharpless, "A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41** (2002) 2596.