

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 5 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04000

研究課題名(和文) 生理的条件下で効率よく機能する化学発光型センサー分子の開発

研究課題名(英文) Development of chemiluminescent sensor molecules that efficiently work under near-physiological conditions

研究代表者

樋口 恒彦 (Higuchi, Tsunehiko)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・教授

研究者番号：50173159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,200,000円

研究成果の概要(和文)：化学発光分子の中で、酵素活性等に応答できるものの多くはフェノキシドの生成を引き起こすため、中性条件下ではほとんど発光しないことが課題であった。本研究では、フェノール性水酸基のオルト位に分子内水素結合を与えるアミド基を配置し水酸基のpKaを低下させることを着想した。対応する分子Aを合成しその発光に関するpHプロファイルを計測することで、アミド基のない化合物Bより酸性側に移動し、中性条件下で発光可能であることが確認できた。また、時間当たりの発光強度がAがBの30倍大きい特徴も有していた。AのN-HをN-Meに変換しNH-O水素結合を形成しないものではBに近い性質を示し、水素結合の効果を明確に示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、AMPDのフェノール性水酸基のオルト位にアミド基を導入することにより、化学発光のpHプロファイルを生理的条件下に有利な方向にシフトさせることができると、反応速度を格段に高めることが明らかになった。反応速度を高めることにより、化学発光の時間分解能を高めることができる利点となると考えられる。分子内水素結合が反応を大きく促進するという知見は、AMPDが2分子に分解したあとの電子移動が律速であることを示唆する。さらに、アミド基導入が化合物の熱安定性を高める効果も見られた。本研究の成果は、今後のジオキセタン型化学発光プローブの設計原理の一つとして応用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：A pioneering chemiluminescent molecule reported by Schaap and co-workers, 3-(2'-spiroadamantane)-4-methoxy-4-(3''-hydroxy)phenyl-1,2-dioxetane (AMPD), does not require enzymatic activation, but is unsuitable for use under physiological conditions. To overcome this limitation, we have developed a new AMPD derivative that contains an acetamido group at the ortho position of the hydroxy group as an intramolecular hydrogen-bonding site in order to lower the pKa value. This compound exhibits a superior chemiluminescence response to AMPD in the physiologically relevant pH range.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：化学発光 分子内水素結合 設計原理 アミド 1,2-ジオキセタン pH 反応速度 反応機構

様式 F-19-2

1. 研究開始当初の背景

近年、生体機能の解明や、疾病の検査、診断のために、生細胞蛍光プローブの開発や生体イメージング技術の進展が著しい。蛍光プローブや、MRI、PET は、すでに様々な研究や疾病の診断に用いられており、大きな成果をあげている。また近年、蛍光分子を用いた蛍光イメージングの開発も盛んに行われている。しかしながら、蛍光プローブや蛍光イメージングでは、励起光を必要とする点で、不均一な生体による散乱光の発生や、励起光の生体透過性が課題ともなっている。

これに対し化学発光は、励起光が必要なく、蛍光分析の1万倍の高感度といった利点を持ち、簡易な検出器のみでよいという簡便さも有する。したがって、化学発光は優れたプローブやイメージング技術になると期待されるが、現時点で生体への適用は限定的である。その一因として、ほとんどの化学発光分子においてアニオンの発生が発光のトリガーであり、生理的 pH 7.4 という条件下ではアニオン生成量が極度に低く発光しにくいことが挙げられる。例えば AMPD では、フェノキシドアニオンから高エネルギー構造であるジオキセタン環への1電子移動によってジオキセタン環が開裂し、これにより生じた活性化エネルギーが発光団（フェノキシド）を励起、減衰過程において光を発する (Figure 1)。

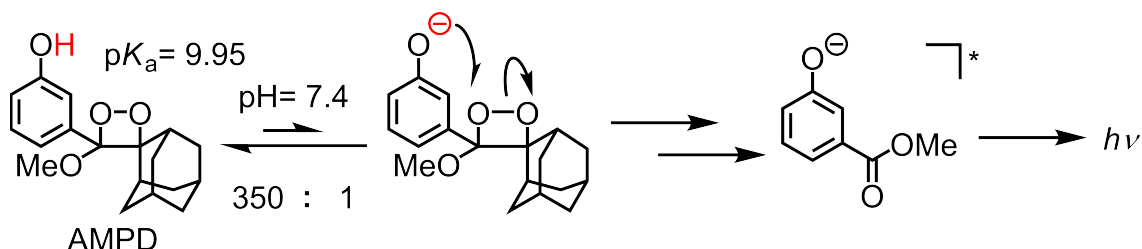


Figure 1

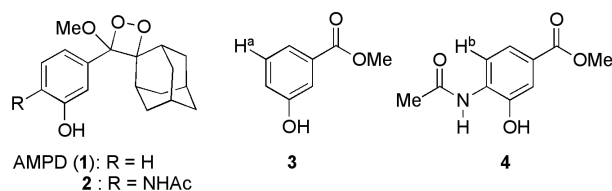
このように、AMPD 以外の多くの化学発光分子においても、アニオンの生成のために高 pH 条件が必要であり、生理的条件 ($pH=7.4$) では、著しくその機能は低下する。AMPD の発光団であるフェノールの pK_a は 9.95 であり、生理的条件 ($pH=7.4$) では、フェノールに対するフェノキシドアニオンの割合は、わずか $1/350$ である。このように生理的条件下においては、AMPD はフェノキシド型を取らず化学発光をほとんど行わない。ゆえに、化学発光を生理的条件下で用いるには如何にしてフェノール性水酸基の pK_a を低下させるかが鍵となる。水酸基の結合する芳香環に電子吸引基を結合させて pK_a を低下させることは既に若干行われてはいたが、電子求引基の結合は、最初の1電子移動過程には不利となるとも考えられた。

2. 研究の目的

著者は、AMPD のフェノール性水酸基の pK_a を化学的な設計で低下させることで、生理的条件下に近い pH 条件で発光する化学発光分子となり、化学発光プローブや化学発光イメージング剤へと繋がることを考え、本目的では従来考えられていなかった水酸基への分子内水素結合を適用することを着想した。アセタミド基などのアミド基は電子供与性であり、且つ隣接する水酸基の pK_a を分子内水素結合により低下させることが期待できる。このため、電子求引基を結合させた場合とは、反応速度等において異なる特性を AMPD に付与できるとも考えた。この分子内水素結合を利用して生理的条件下付近で使用可能で新たな特性を有する AMPD 類の開発を行うこととその特性探究を目的とした。

3. 研究の方法

AMPD のフェノール性水酸基のオルト位に3種のアミド基を導入したものをそれぞれ合成した。それらと無置換の AMPD とで化学発光能の違いを、様々な pH 条件下、光度計を用いて比較した。



また、実際の発光団となる3-ヒドロキシ安息香酸メチルに関しても、4位に対応するアミド基を導入したものを合成し、それらの蛍光スペクトルも比較した。

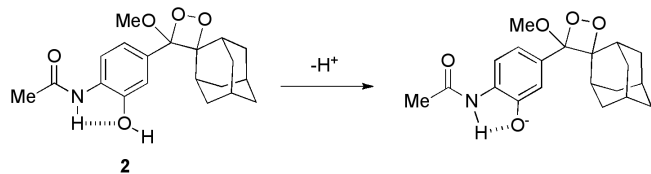


Figure 2.

4. 研究成果

水酸基の隣接基にアミド基を有する AMPD の合成は、以下のスキームで行うことで成功した。

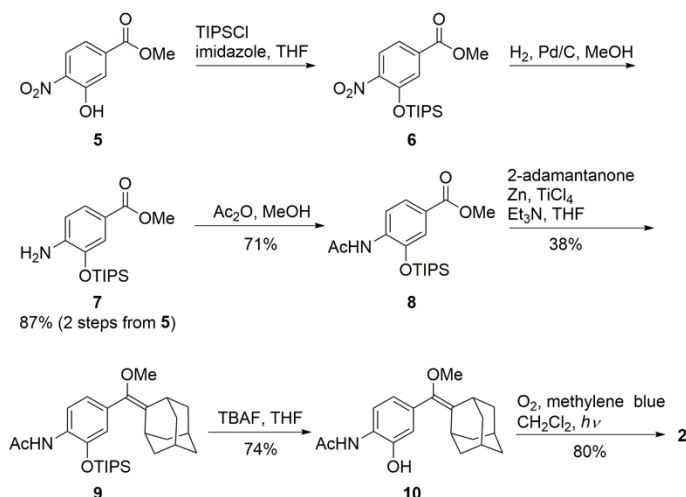


Figure 3. Synthesis of compound 2.

に強度の大きい発光をすることがわかった (inset)。

次に、この違いが、実際に分子内水素結合に依るものなのかどうかについて検討した。化合物 3 と 4 の $^1\text{H NMR}$ スペクトルを pH 11 で比較した (pH 11 では化合物 1、2 はすぐに反応してしまうため)。pH 11 では両化合物ともほぼ全てフェノキッド構造になっている。その結果、4 の H^b は、対応する 3 の H^a よりも 0.71ppm 低磁場にシグナルが存在した。このことは、4 の H^b が、

隣接するアセタミド基のカルボニル基による脱遮蔽効果を受けたものと考えられ、このことは、4 において NH-O 水素結合を形成する側にアミド基が向いていることを示している。このことから、2 においても NH-O 水素結合を形成していると考えられ、この水素結合が pH プロファイルを酸性側にシフトさせていることを強く示唆する。

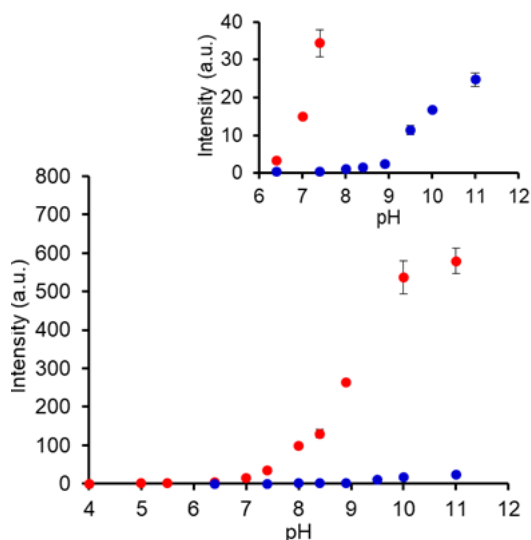
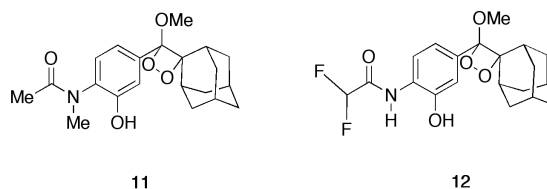


Figure 4. Maximum emission intensity of 1 at 470 nm (blue circles) and 2 at 450 nm (red circles) at various pH values.

一方、予想していなかったことであるが、**1**と**2**では、その反応速度が大きく異なり、速度は約40倍**2**の方が大きかった。**2**のアセタミド基は弱い電子供与性を有するため、その電子供与性によってフェノキシドからO-O結合への1電子移動が促進されたとも考えられたが、その電子供与性は低いため、他の要素が原因とも考えられた。このアセタミド基による反応の促進効果が何によるものなのかを明らかにするため、化合物**11**と**12**を合成してその化学発光特性を比較することとした。**11**は、置換基の電子的効果はアセタミドに近いが、第三級アミドであるため、NH-O水素結合を形成できない構造である。またジフルオロアセタミド基を有する**6**は、水素結合可能なアミドという点では**2**と共通しているが、置換基が電子求引性という違いがあるものである。



分子形がいずれもフェノキシドとなるpH 11の条件で比較した結果、化合物**11**の発光速度は**2**に比較して極めて小さく、**1**よりもさらに一桁低下した (Table 1)。また、化合物**12**の発光速度は**2**の3.6分の1であり、電子求引性のアミドを導入したのにも関わらず速度の低下は顕著ではなかった。以上の結果を総合すると、**1**と比較して**2**が格段に高反応速度を示していることの要因は、主に分子内NH-O水素結合の寄与によるものであり、アミド基の芳香環への電子効果の影響は軽微であることがわかった。

Table 1. Half life of each compound in carbonate buffer (25°C)

Compound	Subst. (R)	Half life	t _{1/2} (sec)
1	H		70.0
2	NHAc		1.8
11	N(Me)Ac		810.0
12	NHCOCF ₂ H		6.5

本研究において得られた知見に基づき、反応機構を考察する。フェノキシドの生成がトリガーとなり、一電子移動が起きることでジオキセタンが開裂し (Figure 4, ステップ I)、3-オキシ安息香酸エステルの1電子酸化体とアダマンタノンの1電子還元体に分解される。その後、アダマンタノンの1電子還元体からエステルに電子が戻ることでエステルの励起状態が生成し (Figure 4, ステップ II)、それが光を放出して基底状態になる。発光メカニズムの中で、一電子移動に関わる I と II のステップが律速と考えられる。

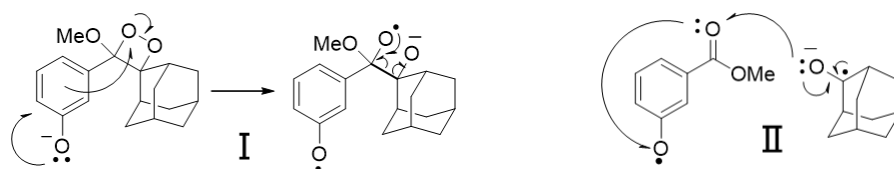


Figure 4. Reaction mechanism of AMPD degradation

フェノキシドへの水素結合は、芳香環自体の電子密度を低下させるため、ステップ I には不利に、ステップ II には有利に働くと考えられる。水素結合ドナーが存在することで大きく化学発光速度が増大するという結果は、本反応の主な律速段階ステップ II であることを強く示唆する。また、化合物**2**と**12**の化学発光速度を比較すると、電子求引性のジ

フルオロアセタミドが導入された **12** の方がやや反応速度が小さいことから、反応速度にはステップ I も部分的に寄与すると考えられる。

さらに、ジオキセタン類の熱安定性についても検討を加えた。**1** と **2** についてそれぞれ重ベンゼン中 65°Cでの経時変化を NMR で観測したところ、興味深いことに **2** の方が **1** より 3 倍安定であった。このことは、緩衝液中では **2** の方が **1** より 40 倍速い速度で分解することと逆である。この **2** の熱安定性の高さは、試薬としての保存性の高さにつながる有用な性質と考えられる。

以上のように本研究の成果により、AMPD のフェノール性水酸基のオルト位にアミド基を導入することにより、化学発光の pH プロファイルを生理的条件に有利な方向にシフトさせることができることと、反応速度を格段に高めることが明らかになった。反応速度を高めることにより、化学発光の時間分解能を高めることができる利点となると考えられる。分子内水素結合が反応を大きく促進するという知見は、AMPD が 2 分子に分解したあとの電子移動が律速であることを示唆する。さらに、化合物の熱安定性を高める効果も見られたことから、保存性においても改善が期待できる。本研究の成果は、今後のジオキセタン型化学発光プローブの設計原理の一つとして応用されていくことが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yosuke Hisamatsu, Takehiro Fukiage, Kojiro Honma, Andrii G. Balia, Naoki Umezawa, Nobuki Kato, Tsunehiko Higuchi	4. 巻 21
2. 論文標題 Effect of the o-Acetamido Group on pH-Dependent Light Emission of a 3-Hydroxyphenyl-Substituted Dioxetane Luminophore	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 1258-1262
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.orglett.8b03913	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 樋口恒彦、本間紘次郎、吹上雄大、久松洋介、梅澤直樹、竹田圭介、加藤信樹
2. 発表標題 フェノキシド生成をトリガーとする化学発光・蛍光分子の生理的pH条件適応のための分子内水素結合戦略
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会2019
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	梅澤 直樹 (Umezawa Naoki) (40347422)	名古屋市立大学・大学院薬学研究科・准教授 (23903)	
研究分担者	久松 洋介 (Hisamatsu Yosuke) (80587270)	名古屋市立大学・大学院薬学研究科・講師 (23903)	