

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K05740

研究課題名(和文) 小分子な蛍光性化合物の開発と歯周病菌の蛍光プローブ創製

研究課題名(英文) Development of small molecule fluorescent compounds and elaboration of fluorescent probe for periodontal bacteria

研究代表者

表 雅章 (Omote, Masaaki)

摂南大学・薬学部・教授

研究者番号：90299032

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：アニリンの2位に $-\text{CH}=\text{CHCF}_3$ 基、5位にシアノ基を有する化合物Aは、サイズの小さく単純な構造にもかかわらず蛍光性を有し、水中でも高い量子収率を示した。本研究では化合物Aが高い蛍光性を示す理由を解明し、これを蛍光団に用いて歯周病菌が産生する加水分解酵素プロリルトリペプチジルアミノペプチダーゼ(PTP)の酵素活性測定用の蛍光プローブ開発を試みた。結果として、化合物Aは、光励起後、主に放射失活の経路で基底状態に戻り、かつ蛍光寿命も長いことが分かった。また、PTPの酵素活性プローブについては、残念ながら化合物Aは蛍光団に適さなかったが、蛍光団にAMCを用いた蛍光プローブの合成には成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化合物Aは水中でも優れた蛍光性を保つ。その理由として、励起状態からの緩和過程が主に放射失活の経路であり、結果的に効率の良い(蛍光量子収率の高い)蛍光性につながっている事実を突き止めることができた。同時に、2位に置換した $-\text{CH}=\text{CHCF}_3$ 基の CF_3 基が本化合物の蛍光性に大きく寄与していることも分かった。これらの知見は、小分子な蛍光性化合物の創製研究において極めて有用な情報である。また、PTP酵素活性測定用の蛍光プローブについても、化合物Aの代替としてAMCを蛍光団として用いることで、目的の蛍光プローブ合成が達成できたことも、社会実装を見据えた学術的意義の高い研究成果と捉えている。

研究成果の概要(英文)：Compound A, which has both a $-\text{CH}=\text{CHCF}_3$ group and cyano group at position-2 and -5 of aniline respectively has good fluorescence with high quantum yield even in water, despite its small size and simple structure. In this study, we tried to elucidate the reason why compound A exhibited high fluorescence, and attempted to develop a fluorescent probe by using compound A for measuring the enzyme activity of prolyl tripeptidyl aminopeptidase (PTP), a hydrolase produced by periodontal disease bacteria. As a result, it was found that compound A returns to the ground state via a radiative deactivation pathway after photoexcitation and has a long fluorescence lifetime. In addition, although compound A was unfortunately not suitable as a fluorophore for the enzyme activity probe of PTP, we succeeded in synthesizing a fluorescent probe using AMC as a fluorophore.

研究分野：有機フッ素化学

キーワード：蛍光性化合物 トリフルオロメチル基 小分子

1. 研究開始当初の背景

蛍光性有機化合物を蛍光団とする蛍光プローブは、蛍光バイオイメージングや酵素活性測定における蛍光基質など、基礎研究から臨床まで幅広く利用されている。このうち、酵素活性測定では、酵素基質に細工を施し、酵素反応が進行して基質が変化した場合に蛍光団が発光するような ON/OFF スイッチを搭載させることで、高感度の酵素活性測定が可能になる。このような酵素活性測定用の蛍光プローブは、基礎研究や診断など、バイオメディカルな分野において不可欠なツールになりつつある。現在利用されている蛍光プローブの蛍光団には、芳香環をつなぎ合わせた拡張共役系分子である Fluorescein や Rhodamine のような分子サイズの大きな多環芳香族化合物が多用されている。一方、基質特異性の高い酵素など、蛍光団のサイズが大きいと酵素反応自体が阻害されてしまうケースでは、Coumarin のような比較的分子サイズの小さな蛍光団が必要とされる。一方、我々が開発した 5-CN-TFPE-aniline は、アニリンの 2 位に 3,3,3-trifluoroprop-1-enyl (-CH=CHCF₃, TFPE) 基、5 位にシアノ (CN) 基をもつ分子サイズの小さな蛍光性化合物で、水中でも蛍光性を保つ極めて稀有な性質を有する。また、分子構造が単純なため、わずかな構造変化で蛍光性が大きく変動することも本化合物の特長である。例えば、電子供与性の窒素原子をアシル化して電子の供与能を下げると、蛍光性が完全に消失する。つまり、5-CN-TFPE-aniline のアミノ基を修飾することで、蛍光性の ON/OFF スイッチを制御することが可能となる。このような背景のもと、我々は、単純な構造の 5-CN-TFPE-aniline が水中でも蛍光性を示す理由の解明と、分子サイズの小ささを利用して基質特異性の高い酵素の酵素活性を測定する蛍光プローブ開発に取り組んだ。

2. 研究の目的

本研究の目的は、(1) 5-CN-TFPE-aniline が水中で蛍光性を発現する理由を解明し、(2) 分子の特長を生かして基質特異性の高い酵素の活性測定用蛍光プローブを開発することである。

本研究は、これまで見過ごされてきた蛍光性化合物の大きさに着目し、分子サイズを極力抑えつつ強い蛍光性をもたせるという相容れない課題に挑戦するものである。蛍光性化合物の用途によっては、分子サイズが小さい方が圧倒的に有利になるのも事実である。例えば、蛍光プローブによって酵素量や活性を測定する場合、蛍光団が大きくなり過ぎると酵素との立体反発が強まり斥力が生まれ、酵素反応が妨げられる。この問題は酵素の基質特異性が高くなるほど顕著に表れ、小さな蛍光団を選ぶことが問題解決の鍵になる。我々が注目したのは歯周病菌が産生する加水分解酵素プロリルトリペプチジルアミノペプチダーゼ (PTP) である。PTP は基質特異性が高いために適切な蛍光団がなく、PTP の蛍光プローブは開発されていない。そこで、サイズが小さく水中で使える 5-CN-TFPE-aniline を蛍光団に用いれば、PTP の蛍光プローブが開発できると考え、本研究に着手した。

3. 研究の方法

(1) 5-CN-TFPE-aniline が水中で蛍光性を発現する仕組みの解明

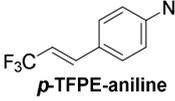
アニリンを基本骨格に、TFPE 基ならびに様々な置換基を有する誘導体を多種合成し、それぞれの蛍光特性、具体的には、励起および蛍光波長、蛍光量子収率、蛍光寿命、放射失活速度定数、無放射失活速度定数を測定する。

(2) 基質特異性の高い酵素の活性測定用蛍光プローブ開発

PTP に着目し、PTP の酵素基質である Ala-Phe-Pro の C 末端に本研究で開発した蛍光団を縮合させ、PTP の活性測定用蛍光プローブを合成する。更に、得られたプローブを酵素基質に用い、PTP の加水分解速度を測定する。

4. 研究成果

まずは、TFPE 基の置換位置で蛍光特性がどの程度変化するかを見極めるため、アニリンのオルト/パラ位にそれぞれ TFPE 基を有するアニリン誘導体を合成し、蛍光波長および蛍光量子収率を測定した(図 1)。結果として、*o*-TFPE-aniline は蛍光性を有し、高い蛍光量子収率 (0.77) を示したが、他方の *p*-TFPE-aniline は蛍光量子収率も低く蛍光性を示さなかった。この理由を解明するため、両者の HOMO-LUMO 計算、蛍光寿命ならびに放射/無放射失活速度定数を測定したところ、両者の HOMO レベル、LUMO レベルともに大差はなく(図 2)、光励起による遷移過程による影響は少ないと判断した。一方、光遷移後の失活過程に大きな違いがみられ、*o*-TFPE-aniline は無放射失活の速度定数が小さく、励起後は放射失活の経路で基底状態に戻るために蛍光寿命が長くなり、蛍光放出の効率も高くなるようである。これに対比して、*p*-TFPE-aniline では無放射失活の速度が大きく、蛍光を放出することなく基底状態に戻りやすい。次に、CF₃ 基の代わりに CH₃ 基を有する *o*-PE-aniline の各種物性を測定したところ、電子求引性の低い CH₃ 基では蛍光性をまったく示さないことが分かった。これらの結果から、TFPE-aniline の蛍光性はオルト置換が必須であり、電子求引性の強い CF₃ 基の存在も重要であると結論付けた。

	蛍光波長 [nm]	蛍光量子収率 [φ]	蛍光寿命 [ns]	放射失活 速度定数 [10 ⁹ s ⁻¹]	無放射失活 速度定数 [10 ⁹ s ⁻¹]
 o-TFPE-aniline	423	0.77	7.32	0.077	0.060
 p-TFPE-aniline	374	0.01	0.23	0.043	4.304
 o-PE-aniline	384	0.26			

Measured in THF (1 × 10⁻⁵ M)

図 1

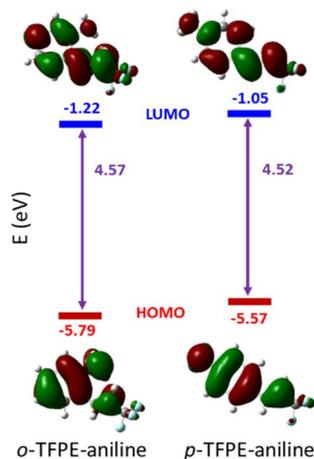
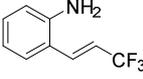
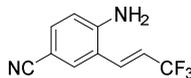
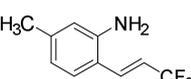
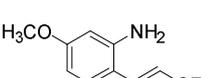
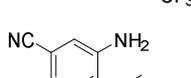
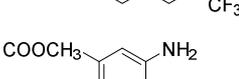


図 2

次に、o-TFPE-aniline を基本骨格として、様々な置換基を導入することで蛍光団としての蛍光性の向上を試みた (図 3)。結果として、アニリンの 5 位に置換基を導入すると蛍光性が変化し、かつ、電子求引性基が蛍光波長を長波長側にシフトさせて蛍光量子収率も高まることを突き止めた。種々の誘導体のうち、5 位にシアノ基が置換した 5-CN-TFPE-aniline (1d) が最も優れた蛍光性を示した。

Compounds	λ_{abs} (nm) ^b	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹) ^b	λ_{abs} (nm) ^c	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹) ^c	λ_{fl} (nm) ^d	ϕ_{f}^d	λ_{fl} (nm) ^e	ϕ_{f}^e
 1a	347	5150	325	4650	427	0.77	452	0.32
 1c 77% ^a	348	7520	334	3200	409	0.47	429	0.53
 1d 42% ^a	346	5200	324	4340	423	0.62	451	0.12
 1e 44% ^a	339	6500	321	5230	410	0.32	434	0.40
 1f 63% ^a	367	6740	346	4220	439	0.82	451	0.89
 1g 65% ^a	372	5500	349	4410	447	0.74	463	0.82

^a Isolated yields. ^b Observed absorption maximum at the longest wavelengths in THF and corresponding ϵ s. ^c Observed absorption maximum at the longest wavelengths in H₂O:DMSO = 9:1 and corresponding ϵ s.

^d Fluorescence maximum peak wavelengths in THF, excitation at $\lambda = 350$ nm for 1a, 330 nm for 1c, 345 nm for 1d, 345 nm for 1e, 360 nm for 1f, 370 nm for 1g and corresponding ϕ_{f} s. ^e Fluorescence maximum peak wavelengths in H₂O:DMSO = 9:1, excitation at $\lambda = 220$ nm for 1a, 290 nm for 1c, 330 nm for 1d, 350 nm for 1e, 370 nm for 1f, 350 nm for 1g and corresponding ϕ_{f} s.

図 3

(2) PTP 活性測定用の蛍光プローブ開発

上記の結果、最も蛍光性の優れた 5-CN-TFPE-aniline (1d) を蛍光団に用い、PTP 活性測定用プローブの合成に着手した。標的となる PTP 蛍光プローブ (2、図 4) は、PTP 基質であるトリペプチド Ala-Phe-Pro の C 末に蛍光団 1d がアミド結合した構造をもつ (図 4)。蛍光団 1d の窒素原子がアミド結合している限り、

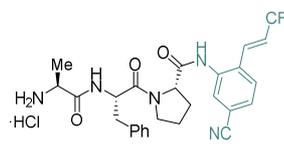


図 4

アミノ基の電子供与性が損なわれ、1d は蛍光性をもたない。一方、酵素によりアミド結合が切断されると、遊離した 1d は蛍光性を取り戻すため、蛍光強度を測定することで PTP の酵素活性が測定できる。このような推測のもと、標的の PTP 活性測定プローブ 2 の合成を行った。C 末のプロリン (3) と蛍光団の縮合を行い、N 末側の Ala-Phe と縮合させる経路を採用し、計 4 工程、22%の収率で、目的の 2 を得た (図 5)。この際、1d のアミノ基は求核性に乏しく、3 と

の縮合にはプロリン C 末を酸塩化物に変換する必要があった。同様に、蛍光団に AMC をもつ類縁体も合成し、蛍光団が PTP 活性測定に及ぼす影響を見ることとした。

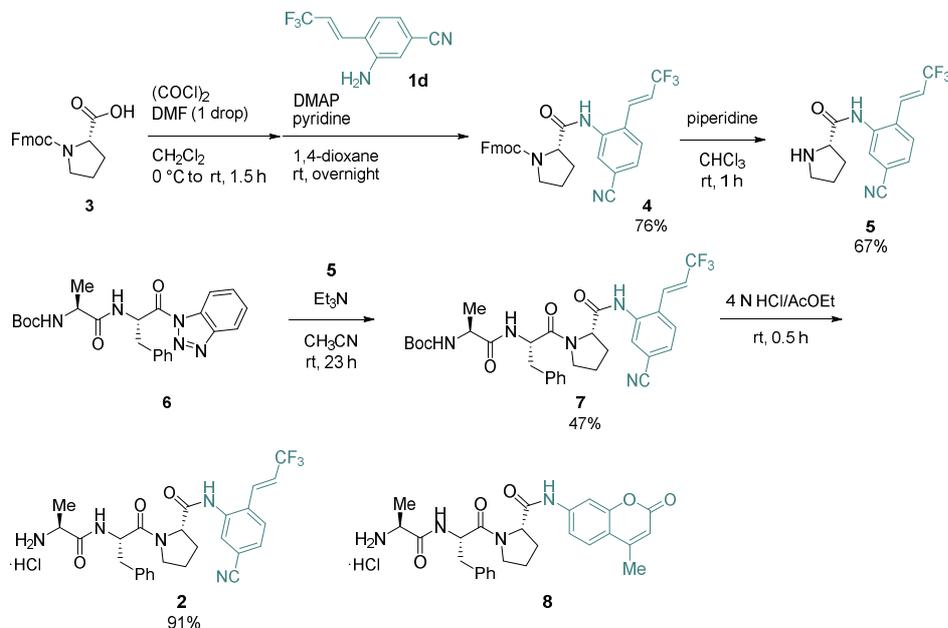


図5

次に、得られた **8** および **2** を用いて PTP 活性を測定した。Tris 塩酸 buffer 中、 $100\ \mu\text{M}$ の **2** を加えて 37 で 3 分間プレインキュベート後、各種濃度の PTP 酵素溶液を添加して酵素反応を行い、加水分解により生じる **1d** の蛍光強度を測定した (図 6)。結果として、蛍光団に AMC をもつ **8** は、添加した PTP 濃度依存的に加水分解反応が進行し、AMC 由来の蛍光強度が増加した (図 6 左)。つまり、本研究の成果として、**8** は PTP 酵素活性を測定できる蛍光プローブとして十分利用できることが分かった。一方、蛍光団に **1d** をもつ **2** は、PTP 濃度を高めても加水分解反応は進行せず、PTP 活性を測定できなかった (図 6 右)。

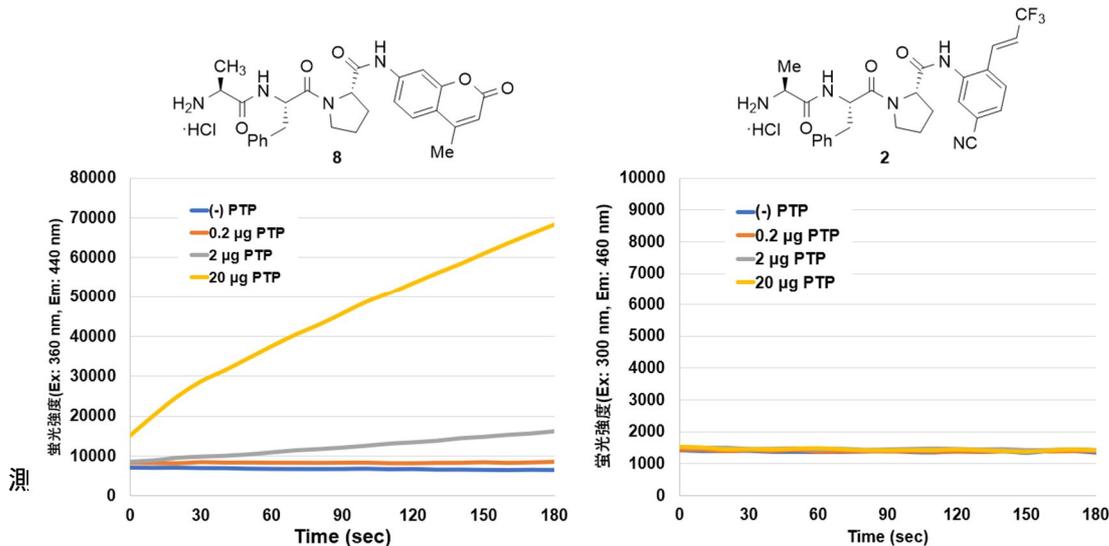


図 6

上記の結果から、**2** の加水分解反応が進行しなかった理由として、当初予測していたよりも **1d** の分子サイズが大きいことが考えられる。そこで、PTP の活性部位と **2** の結合様式を計算したところ (図 7)、**1d** の CF_3 基 (黄色円、水色部) がフェニル基 (赤色部) と反発し、酵素ポケットにぶつかる様子が確認できた。結果として、**2** は PTP の活性部位に入りきらず、酵素反応が進行しなかったものと結論付けた。同時に、**2** のフェニルアラニングリシンまたはアラニンに変更すると、PTP の活性部位に収まり得ることも示唆された。

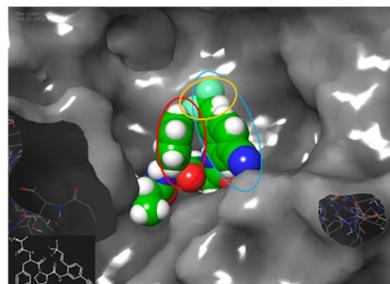


図 7

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 Futa Ogawa, Yukiko Karuo, Ryuji Yamazawa, Kanae Miyana, Kazushige Hori, Keita Tani, Kengo Yamada, Yuki Saito, Kazumasa Funabiki, Atsushi Tarui, Kazuyuki Sato, Kiyoshi Ito, Kentaro Kawai, and Masaaki Omote*	4. 巻 85
2. 論文標題 Synthesis of Small Fluorescent Molecules and Evaluation of Photophysical Properties	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 1253-1258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.9b02857	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 軽尾友紀子、東野崇太、樽井敦、佐藤和之、山澤龍治、伊藤潔、河合健太郎、表雅章
2. 発表標題 歯周病菌産生酵素活性測定用プローブ合成と活性評価
3. 学会等名 日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 軽尾友紀子、東野崇太、樽井敦、佐藤和之、河合健太郎、表雅章
2. 発表標題 歯周病菌の蛍光プローブ創製
3. 学会等名 第45回フッ素化学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小川風太、軽尾友紀子、谷敬太、樽井敦、佐藤和之、河合健太郎、表雅章
2. 発表標題 2-Trifluoropropenylanilineを基本骨格とする低分子蛍光性有機化合物の合成と利用
3. 学会等名 第45回反応と合成の進歩シンポジウム
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	軽尾 友紀子 (Karuu Yukiko) (30826235)	摂南大学・薬学部・講師 (34428)	
研究分担者	伊藤 潔 (Ito Kiyoshi) (50201926)	摂南大学・薬学部・教授 (34428)	
研究分担者	船曳 一正 (Funabiki Kazumasa) (50273123)	岐阜大学・工学部・教授 (13701)	
研究分担者	谷 敬太 (Tani Keita) (60207165)	大阪教育大学・教育学部・教授 (14403)	
研究分担者	河合 健太郎 (Kawai Kentaro) (60826246)	摂南大学・薬学部・准教授 (34428)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------