

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21197

研究課題名(和文)近赤外2光子励起を用いた1細胞内での生物活性物質のin-situ合成

研究課題名(英文) In-situ synthesis of bioactive substances in a cell using near-infrared two-photon excitation

研究代表者

安倍 学 (ABE, MANABU)

広島大学・先進理工系科学研究科(理)・教授

研究者番号：30273577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：近赤外2光子励起を用いた1細胞内で生物活性物質をin-situ合成する手法の開発に挑戦し、生命現象の解明と新治療法の開発につながる究極のドラッグデリバリーシステムの構築を目的とした。近赤外領域に高い2光子感応性を有するスチリル基を持つクマリン誘導体1が、810 nm付近に2光子吸収能を有していることを見出し、1の光二量体の生成が確認できた。この実験結果は、当初本研究で目標としていた、近赤外2光子励起を用いた1細胞内で生物活性物質をin-situ合成する手法の開発につながる有望な結果である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

必要な機能性材料や活性物質を必要な量だけ自在に作り出すことができる有機合成化学反応の開発は、持続的に発展する社会の構築には欠かせない。そのような試験管内での自在合成を、生命の源である細胞内で実施する事ができれば、生命現象の解明のみならず究極のドラッグデリバリーシステムの構築に繋がり、生命化学研究に新たな風を吹き込むと強く期待される。本研究では、近赤外2光子感応性の発色団を用いた有機光反応が細胞内で可能であるかを精査し、複雑細胞環境下での有機合成反応の開発の手がかりを掴むことに挑戦した。この事により、生命科学研究にパラダイムシフトが起こり、臨床での新たな疾患治療法へと展開することが可能である。

研究成果の概要(英文)：We attempted to develop a method for in-situ synthesis of bioactive substances in a single cell using near-infrared two-photon excitation, with the aim of constructing an ultimate drug delivery system that will lead to the elucidation of life phenomena and the development of new therapeutic agents. We found that a coumarin derivative 1, which has a styryl group with high two-photon sensitivity in the near-infrared region, has two-photon absorption capacity around 810 nm, and the formation of a photodimer of 1 was confirmed. These experimental results are promising for the development of an in-situ synthesis method of biologically active substances in a single cell using near-infrared two-photon excitation, which was the initial goal of this study.

研究分野：有機光化学

キーワード：2光子励起 ドラッグデリバリー 光[2+2]付加環化反応

## 1. 研究開始当初の背景

Sharpless と Kolb らが、タンパク質存在下での 1,3-双極子付加環化反応(Huisgen 反応)に成功して以来(*JACS*, **2004**, 12809), 生物活性物質(以下, 活性物質と略)による生命現象発現機構の解明に関する研究が活発化している. 一方, 生命の源である細胞内での活性物質の役割を研究する場合, その物質を細胞内に運ぶ必要がある. 高い生物活性を示す物質は生体内条件下で化学的に不安定なことがあり寿命が短く, 細胞内に導入する以前の段階で分解が起こり, 細胞内でのその生物活性機構を研究するのは困難である. このような状況を踏まえ, 化学的に不安定な化合物などの活性物質を 1 細胞内で *in-situ* 合成する事ができれば, より詳しく生命現象の解明に取り組むことができ, また, 究極のドラッグデリバリーシステムを構築できると考えた. 先行研究として, Meggers らは, 細胞内での金属触媒反応により蛍光材料を合成し, 新たな細胞イメージング法の開発に成功している(*ChemComm*, **2013**, 1581). また, 細胞内での還元反応, クロスカップリング反応, ラジカル重合反応も報告されている(*ChemBioChem*, **2012**, 1116; *NatChem*, **2011**, 239; *NatChem*, **2019**, 578). しかしながら, 試験管内実験と同様の精度と効率を示す細胞内合成反応の開発は, 有機合成反応にとって不純物が多く存在する細胞内での触媒の失活のため, 試行錯誤が続けられていおり困難な状況である. もし, 無触媒反応によって細胞内で活性物質を合成する手法を開発できれば, 生命化学研究のパラダイムシフトに貢献できる. 例えば, 無触媒熱反応が考えられるが, 細胞を 37°C 以上の高温にすることは出来ない. そこで, 本研究では,

結合形成反応において, 反応基質以外の試薬を用いる必要がない有機光反応に着目した. 具体的には, 細胞毒性が少なく, かつ, 生体透過性が高い 680-1050 nm の近赤外光を利用した光反応によって, 1 細胞内でオキセ

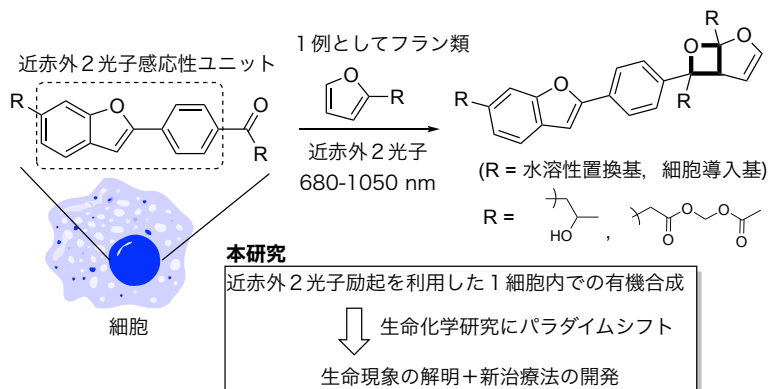


図1 本研究: 近赤外2光子励起を用いた生物活性物質の1細胞内での合成反応の開発

タン類などの高歪骨格を持つ不安定生理活性物質を *in-situ* 合成する手法の開発に挑戦する. このことにより, 生命化学研究にブレイクスルーをもたらす (図1).

## 2. 研究の目的

活性物質は生命の営みに欠かせないものであり, その機能と機能発現機構の解明は, 豊かな社会の形成とその持続的な発展に寄与する. 生理活性物質が生体内組織の「どの場所」で「どのように」機能するのかを”可視化”することができれば, 生命現象の解明に大きく繋がり人類が直面する疾患に対する薬剤の開発に貢献することができる.

Roger Chen らは, GFP などの蛍光標識物質を用いて, 細胞内での活性物質の場所を特定することに成功してきた. 場所の特定のみならず, 活性物質によって生体高分子が過渡的な活性状態になり機能が直接伝達される様子を観測することができれば, 生命現象の

解明に対してさらに大きな情報を得ることができる。本研究の実施者は、これまでに、JST-CREST 研究「先端光源を駆使した光化学・光技術の融合展開」〔研究代表者：小林孝嘉博士(東京大名誉教授)；研究分担者：河西春郎(東京大学医学系)，安倍学, 2010.10-2016.3〕と基盤研究 B「近赤外 2 光子感応性新規光解離性保護基の合成と反応：ドラッグデリバリーへの基盤研究, 2017.4-2019.3」において，生体内試料の深部に到達する近赤外光( $680 \text{ nm} < h\nu < 1050 \text{ nm}$ )に対して 2 光子吸収能を持つ光解離性保護基の発色団の構造設計，化学合成，並びにモデル化合物の 2 光子光解離反応を検討した。ドナーアクセプター置換基をスチルベン骨格に導入する独自の分子設計の結果，本萌芽研究の提案に繋がるベンゾフラン誘導体 **NPBF** が小さな  $\pi$  電子系にも関わらず，740 nm に 60 GM 程度の比較的高い 2 光子吸収性を示す物質であることを見出し，近赤外 2 光子により安息香酸などのカルボン酸を定量的に放出できることを見出している(*ChemComm*, **2016**, 331; *ACS Omega*, **2016**, 193; *BJOC*, **2019**, 863; 特許 JP 2015124171)。この近赤外 2 光子吸収性環状スチルベン骨格を持つカルボニル化合物やスチレン類を用いれば，本研究の目的である「1 細胞内での光環化付加反応を達成」することができるかと確信した。

### 3. 研究の方法

次の 2 つの重点研究課題を研究期間内に実施した。

(1) 近赤外 2 光子を用いた試験管内での光誘起付加環化反応の開発: オキセタン(4 員環エーテル)骨格を有する化合物は，特異な生物活性を示すことが知られている。例えば，oxetin や taxane alkaloids などは，抗菌作用や抗がん活性を示す(図 2 左)。

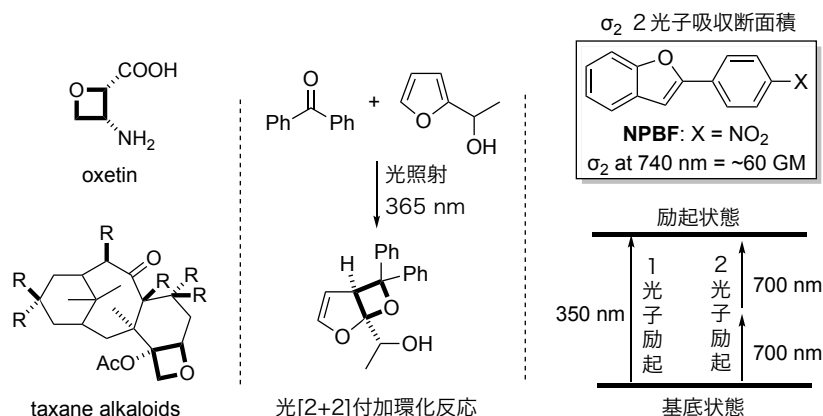


図 2 光[2+2]付加環化反応によるオキセタンの生成と 2 光子励起

それらの生物活性は，分子歪を有する 4 員環構造と分極したエーテル結合の開裂反応に由来する。応募者は，これまで，フルフリルアルコールなどのアルケンとベンゾフェノンとの 365 nm の紫外光を用いる光[2+2]付加環化反応において，位置及び立体選択的に双環性オキセタンの合成が可能であることを明らかにした(図 2 中，*JACS*, **2011**, 2592)。このように，光反応は，基質以外の試薬を用いることなく生物活性な不安定構造・オキセタン環を効率的に構築する極めて有効であるが，365 nm の紫外光を用いるこの反応を生きた生体試料で実施することは難しい。細胞毒性が低く生体透過性が高い近赤外領域の 680-1050 nm の光を光[2+2]付加環化反応に用いることができれば，生きた細胞内での光付加環化反応は可能である。しかしながら，ベンゾフェノンなどのカルボニル化合物は近赤外領域に光吸収を持っておらず，従来の 1 光子を用いるカルボニル化合物の光励起は不可能である。そこで，最近，応募者らが見出したベンゾフラン骨格が近赤外領域の 740 nm に高い 2 光子吸収を持つことを活用することで，この問題を解決できると考えた(図 2 右，*Synthesis*, **2017**, 3337, tutorial review)。つまり，2

光子感応性の $\pi$ 共役ユニットを持つカルボニル化合物やスチレン類を用いて、まず、試験管内での近赤外2光子による光[2+2]付加環化反応を開発する。次に、以下に示す2つ目の重要研究課題(2-2)に挑戦する。2光子励起とは、フェムト秒パルスレーザー光源を用いて、1光子励起の半分のエネルギーの光子2個で電子励起状態を発生する手法であり、励起種を3次的に時空間制御して発生することができる(図2右下)。例えば、700 nmの2光子で350 nmの1光子で生じる電子励起状態分子を発生することができる(Kawata *et al.*, *Nature*, **2001**, 697)。

(2) 2光子顕微鏡を用いた1細胞内での光付加環化反応の開発とドラッグデリバリーへの展開：基質を細胞内に導入できる水溶性置換基(R)や酵素で水溶性に変化するアセトキシメチルを導入したカルボニル化合物とアルケンを合成し、それらの細胞毒性実験を行ってIC<sub>50</sub>が大きく細胞毒性が少ない基質を細胞実験に用いる(図1)。広島大医系科学研究科の森岡グループとの共同研究により、フェムト秒レーザーを備えた2光子顕微鏡を用いて近赤外の2光子照射の細胞実験を実施し、究極のドラッグデリバリーシステムを構築する。

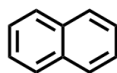
#### 4. 研究成果

より大きな2光子吸収断面積を示す分子設計として、初めに $\pi$ 共役系の拡張が挙げられる。例えば、2光子吸収断面積が0のベンゼンに対して一つだけ芳香環を加えたナフタレン

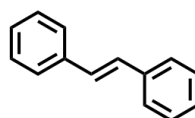
は 0.9 GM を示すことが知ら



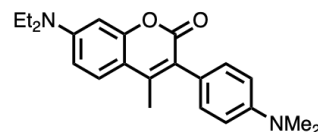
0 GM



0.9 GM at 530 nm



12 GM at 514 nm



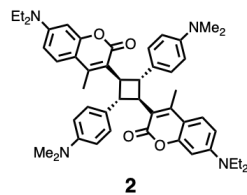
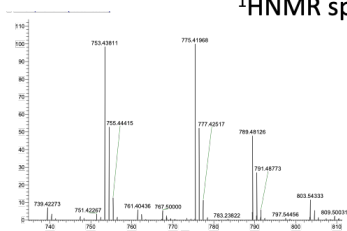
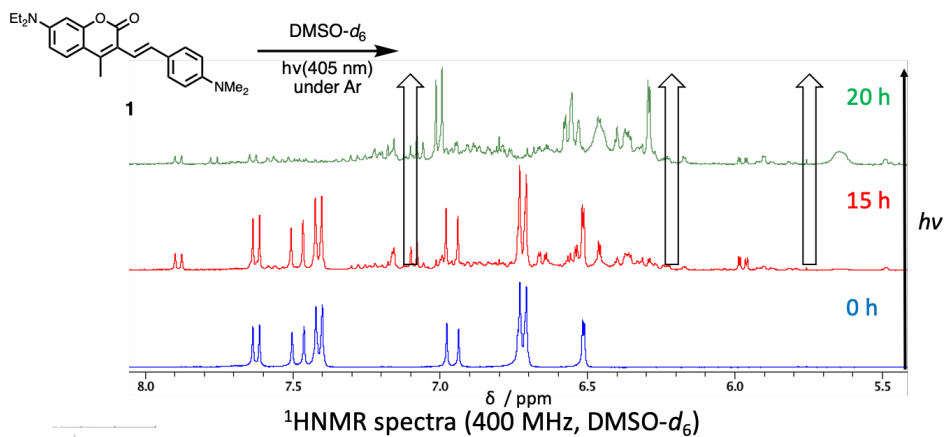
18 GM at 680 nm

られている。芳香環の間に二重結合を一つ挟んだ *trans* スチルベンはより大きな2光子断面積を持ち、さらに、共役系にドナーやアクセプターを導入することで、二光子吸収断面積が大きくなることが知られている。当研究室では以前にドナー- $\pi$ -ドナー骨格を持つマリニン誘導体が、700 nm 付近に高い2光子吸収断面積を持つことを見出している。そこで、本研究ではこの化合物 **1** を用いて、まず初めに1光子励起による光反応を行い、[2+2]環化付加反応が進行するかを確かめることとした。

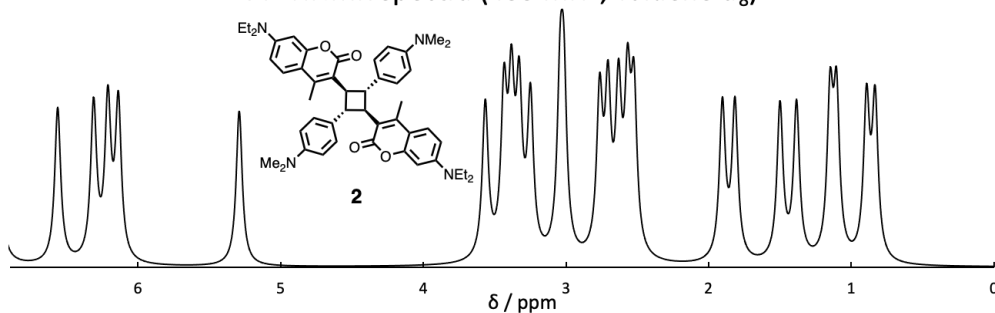
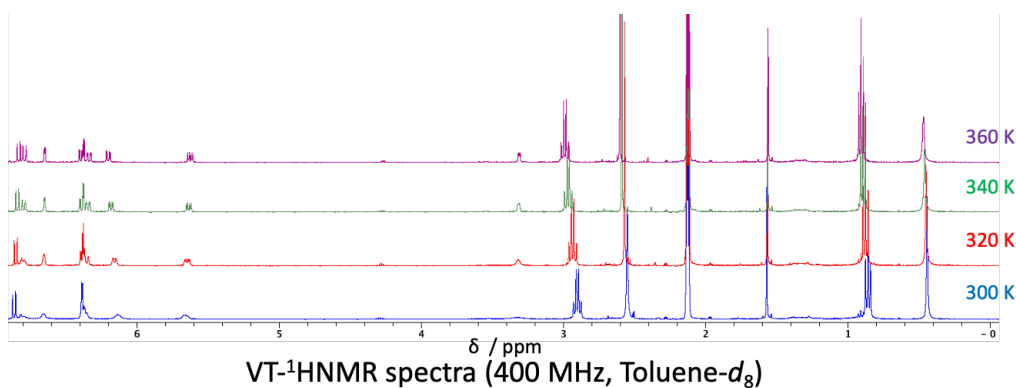
重 DMSO に化合物 **1** を加え、Ar 雰囲気下で 405 nm の LED ランプを照射した。プロトン NMR で光反応を追跡したところ、5.6 ppm のブロードなピークを含む、新たなピークの現れを確認した。GPC で生成物を単離し、質量分析を行ったところ、化合物 **1** の二量体 **2** が存在していることが示唆された。

生成物の VT-NMR を測定したところ、温度を上昇させるにつれブロードなピークがシャープになる様子を観測し、生成物は立体障害が大きな部位を有しており、300 K ではその分子運動が制限されていることが示唆された。

さらに、理論計算による環化付加物 **2** のプロトンの遮蔽磁場の予測結果と実験値を比較したところ、光照射によって化合物 **1** は分子間での[2+2]付加環化物ができていると考えられ、3.3 ppm と 5.6 ppm のピークはそれぞれ付加環化物のシクロブタン部位のプロトンであることが示唆された。



Exact Mass: 752.43



Predicted NMR spectrum of **2** @rB3LYP/6-311G+(2d, p) gas phase

生成物の NOESY NMR を測定すると四員環のプロトンと考えられるピーク同士の相関、クマリン部位のメチル基のプロトンとジメチルアニリン部位の芳香族プロトンのピークとの相関が観測された。以上のことから、光照射により[2+2]環化付加物 **2** が生成していることが示唆された。

以上をまとめると、1細胞内で2光子励起を用いて有機合成を行うという最終目的を掲げ、2光子感応性分子 **1** の光化学的性質を調査した。重 DMSO 中の **1** に対して Ar 雰囲気下で 405 nm の光を照射し1光子励起させた結果、[2+2]環化付加物 **2** が生成することがわかった。今後の展望としては、まず、2光子顕微鏡を用いて同条件で光反応を行い、**2** が生成することを確認するよいである。その後、1細胞内で2光子励起法を用いた同反応に挑戦する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takano Ma-aya, Abe Manabu	4. 巻 24
2. 論文標題 Photoreaction of 4-(Bromomethyl)-7-(diethylamino)coumarin: Generation of a Radical and Cation Triplet Diradical during the C-Br Bond Cleavage	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 2804 ~ 2808
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.2c00694	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 -
1. 著者名 Lin Qianghua, Guo Runzhao, Hamao Kozue, Takagi Ryukichi, Abe Manabu	4. 巻 51
2. 論文標題 2-(4-Nitrophenyl)-1H-indolyl-3-methyl Chromophore: A Versatile Photocage that Responds to Visible-light One-photon and Near-infrared-light Two-photon Excitations	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 153 ~ 156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.210668	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Gomez Fernandez Mario Andres, Lefebvre Corentin, Sudau Alexander, Genix Pierre, Vors Jean Pierre, Abe Manabu, Hoffmann Norbert	4. 巻 27
2. 論文標題 Studies on The Application of The Paterno Buchi Reaction to The Synthesis of Novel Fluorinated Scaffolds	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemistry - A European Journal	6. 最初と最後の頁 15722 ~ 15729
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.202102621	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 該当する
1. 著者名 Pham Thuy Thi Thu, Chitose Youhei, Tam Tran Thi Thanh, Tseng Wei-Lun, Lin Tzu-Chau, Abe Manabu	4. 巻 50
2. 論文標題 Impact of Five-membered Heterocyclic Rings on Photophysical Properties Including Two-photon Absorption Character	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 1810 ~ 1813
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.210420	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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	森岡 徳光  (MORIOKA NORIMITSU)  (20346505)	広島大学・医系科学研究科(薬)・教授    (15401)	

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			
フランス	レンヌ大学			
台湾	台湾国立中央大学			