

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06525

研究課題名(和文) 閉環 - 開環により蛍光応答を制御可能な近赤外シアニン型蛍光色素の創製

研究課題名(英文) Development of near infrared cyanine dyes controlled by ring closing-opening system

研究代表者

高木 晃 (Takagi, Akira)

神戸薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：00758980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではフルオレセインやローダミンのような閉環 - 開環構造を有する新規蛍光分子の創製を目指し、ジアミン含有シアニン色素の合成と評価を行った。
今回新たにN,N-ジメチルプロパンジアミンを有するシアニン色素が、pHの変化により構造の変化および蛍光応答の変化を示すことを明らかにした。さらにN,N'-ジメチルエチレンジアミンを用いた際に得られた副生成物を利用することで新たなメカニズムを有する構造変換反応を見出し、新規蛍光色素の合成にも成功した。
今後本システムを利用した蛍光プローブへの応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

蛍光プローブは目的とする被験物質を可視化することができるため、新規蛍光プローブの開発は生命現象を解明するために広く用いられる重要な研究課題である。
本研究では、従来より蛍光プローブに広く用いられているフルオレセイン類に特有の性質をシアニン色素へと導入することにより、従来とは異なる仕組みにより蛍光応答を示すシアニン型の蛍光プローブへの応用が期待される。
本研究を基にさらに新たな機能を持つ蛍光分子が創製されることで、プローブへと利用可能な蛍光分子の選択肢が増え、バイオイメージング分野においても貢献できるものとなる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we synthesized and evaluated cyanine dyes containing diamines to develop new novel fluorescent molecules possessing a ring-closing-ring-opening system similar to that of fluorescein and rhodamine. Cyanine dyes containing N,N'-dimethylpropanediamine were found to exhibit changes in structure and fluorescence response according to changes of pH. Furthermore, by utilizing the byproduct obtained with N,N'-dimethylethylenediamine, a new structural transformation reaction with a unique mechanism was found, and a new fluorescent dye was successfully obtained.
This system is expected to be applied to fluorescent probes in the future.

研究分野：有機合成化学

キーワード：蛍光 近赤外 シアニン ジアミン

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

フルオレセインやローダミン B はキサンテン骨格を持つ色素であり、カルボキシ基が閉環状態と開環状態の平衡にある。これらの構造は、閉環構造ではスピロ炭素で共役系が切断されるため蛍光応答は弱く、開環構造では共役系が伸長され強い蛍光応答を示す。この特徴を利用して、キサンテン系蛍光色素は、生体分子を検出するための turn on 型の蛍光プローブとしても多く活用されている。

一方でシアニン色素は、両端に窒素原子を含む共役系構造を持ち、その共役系の長さに依存して波長を変化させることができる。なかでも Cy7 は蛍光波長が 700 nm を超える近赤外蛍光発光を示す化合物であり、生体深部を観測する蛍光プローブとしての応用が期待される。しかし、シアニン色素はイミニウムイオン型で安定に存在するため、色素単独での消光メカニズムを持たせることが困難であった。そのため Cy7 は蛍光タグとして、化合物を結合して標識するには非常に有用であるが、生体内事象を観測するためのプローブとして適用するためには、その他の消光団を結合させる必要がある。すなわちシアニン色素を用いた蛍光プローブの設計は汎用されているキサンテン色素を用いた場合と比べ、複雑であるといえる。

2. 研究の目的

今回申請者は、プローブ分子へ応用可能な近赤外蛍光シアニン色素を創製することを目的とする。この目的達成のために

1. 中性条件において任意の条件で蛍光の on-off 制御ができるか
2. 機能性を持たせた誘導体展開は容易か
3. 生体環境中での物性は良好か

上記の三つの課題について順次解決し、プローブ分子への応用を目指した。

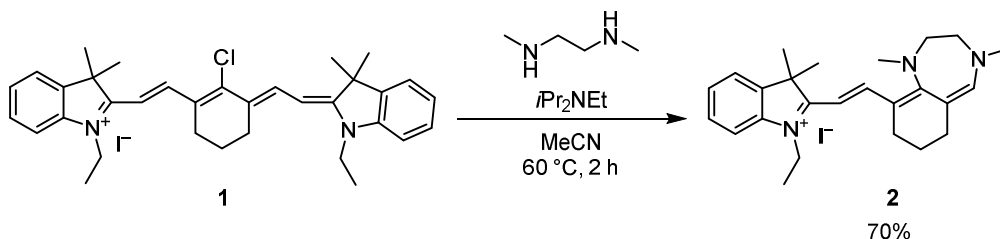
3. 研究の方法

閉環 開環反応メカニズムを有するシアニン分子の創製を目的とし、ジアミン構造を導入したシアニン分子の合成を行い、NMR または蛍光測定を行うことで構造の変換および蛍光応答の変化を調べた。得られた副生成物の結果から新規分子の合成を行い、新規プローブとなり得る候補分子の創製に着手した。

4. 研究成果

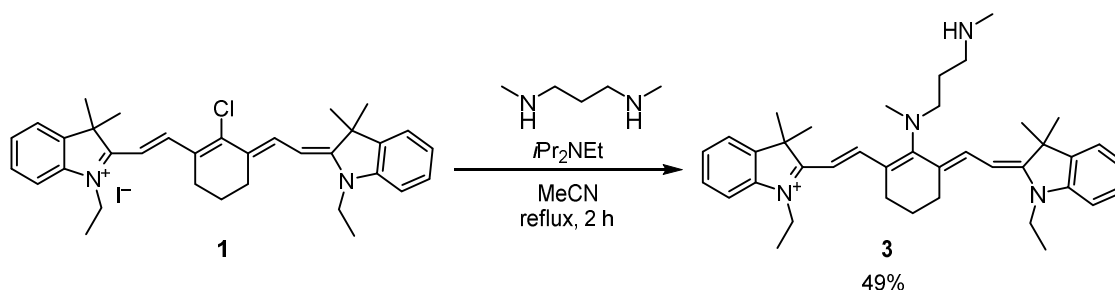
・ジアミン含有シアニン色素の創製と副生成物の特定

当初の目的通りに *N,N'*-ジメチルエチレンジアミンを 1 へ付加したところ、目的のアミン付加体は得られず、さらに環化・逆アルドール反応が進行したと考えられる 2 が高収率で得られた。本反応はシアニン構造のインドレニンユニットが脱離しやすいこと、アミンの求核性が高いために分子内での 7 員環形成が予想以上に速かったことに起因すると考えられる(Scheme 1)。



Scheme 1

2 が得られた原因が 7 員環の環化速度の問題であると考えたため、より環化速度が遅くなると考えられる *N,N'*-ジメチルプロパンジアミンをアミンユニットとして用いたところ、予想通りアミン付加体 3 が主生成物として得られた(Scheme 2)。

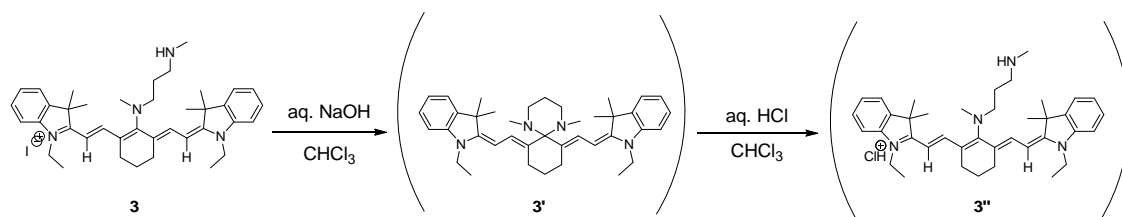


Scheme 2

得られた 2 および 3 の蛍光測定をしたところ、2 は 620 nm 付近に、3 は 790 nm 付近に極大蛍光波長を持つ蛍光スペクトルが得られた。いずれの化合物も 100 nm 以上の Stokes シフトを示し、良好な蛍光特性を示すことが明らかになった。

・C3 ユニットを含むシアニン化合物の創製と pH 変化による応答変化

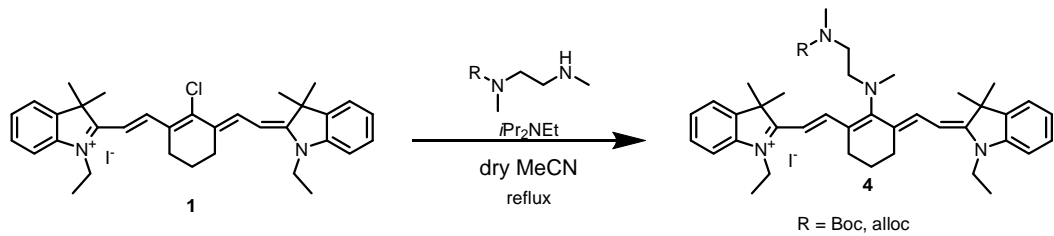
得られた 3 の pH による閉環 - 開環構造の変化を調べる目的で塩基性条件での分液操作を行った。青色固体であった 3 を水酸化ナトリウム水溶液とクロロホルムで抽出操作を行うと、有機層から緑色の固体を得られた。¹H NMR により構造を確認すると、3 の特徴的な二重結合のプロトンのピークが消失し、その他のピークも全体的に高磁場シフトする結果が得られた。窒素上のメチル基のピークも単一となったことから、3 は塩基性条件下で閉環構造を取っていることが示唆された。再び塩酸とクロロホルムにより分液操作を行ったところ、青色の固体が得られ、¹H NMR のスペクトルにも再び 3 のピークが見られた(Scheme 3)。さらに 3 の水溶液の pH を中性 塩基性 酸性と変化させ蛍光スペクトルの測定を行ったところ、中性条件では 3 に特徴的な 790 nm にて強い蛍光応答が見られたが、塩基性条件へ変化させた際には 790 nm の蛍光応答が消失した。さらに酸性条件へと変化させた際には初期の中性条件の時よりは強度の低下が見られたが、790 nm の蛍光応答が再び見られた。以上の結果より 3 は閉環 - 開環メカニズムを有する新規シアニン蛍光色素であることが明らかになった。現在 3 の性質を利用した蛍光プローブへの応用を検討中である。



Scheme 3

・C2 ユニットを含むシアニン化合物の創製と脱保護条件の検討

Scheme 1 により得られた 7 員環分子について、環化生成物得られることを利用した蛍光プローブへの応用が可能だと考え、新たに 7 員環形成を伴う構造変化が可能なシアニン色素の創製を目指した。各種保護基を導入した *N,N'*-ジメチルエチレンジアミンを合成し、1 への付加を行ったところ、Boc 基および alloc 基を含むアミン付加体 4 を得ることができた(Scheme 4)。得られた 4 の脱保護を伴う 7 員環形成を検討したところ、現段階では目的の 7 員環を得るには至っていない。今後適切な保護基またはシアニン構造を選択することで目的とした 7 員環形成を伴う蛍光応答の変化が可能なプローブへの応用が可能になると期待される。



Scheme 4

以上、今回の研究により新たなジアミン含有シアニン型蛍光分子 **3** の創製に成功した。**3** は pH 変化に伴う NMR スペクトルの変化および蛍光応答の変化から、当初目的とした閉環 開環メカニズムを有する分子であることが示唆された。また、副生成物として得られた **2** への変換を利用した新規プローブ候補分子の創製を目指し、保護されたエチレンジアミン付加体 **4** の合成に成功した。今後これらの分子の特性を解明することで、ジアミン構造の特徴を利用した蛍光の on-off 制御が可能となり、新たなプローブ分子への応用が可能になると期待される。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Okuda Kensuke, Takashima Ippei, Takagi Akira	4. 巻 72
2. 論文標題 Advances in reaction-based synthetic fluorescent probes for studying the role of zinc and copper ions in living systems	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 1~12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcfn.22-92	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 Yamada Tsuyoshi, Fujii Akiko, Park Kwihwan, Furugen Chikara, Takagi Akira, Ikawa Takashi, Sajiki Hironao	4. 巻 -
2. 論文標題 Catalytic Intramolecular Cyclization of Alkynyl Cyclic Acetals via Chemoselective Activation Leading to Phenanthrene Core	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/bcsj.20220036	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 Ikawa Takashi, Yamamoto Yuta, Heguri Akito, Fukumoto Yutaka, Murakami Tomonari, Takagi Akira, Masuda Yuto, Yahata Kenzo, Aoyama Hiroshi, Shigeta Yasuteru, Tokiwa Hiroaki, Akai Shuji	4. 巻 143
2. 論文標題 Could London Dispersion Force Control Regioselective (2 + 2) Cyclodimerizations of Benzynes? YES: Application to the Synthesis of Helical Biphenylenes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 10853~10859
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.1c05434	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 Takagi Akira, Usuguchi Kazuki, Takashima Ippei, Okuda Kensuke	4. 巻 71
2. 論文標題 Development of 1,3,6-Tribenzoylated Glucose as an Antiausterity Agent Targeting Tumor Microenvironment	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 641~649
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c23-00212	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 -

〔学会発表〕 計20件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 高嶋一平、森田知菜美、矢田紗季乃、三浦佑介、高木 晃、中田栄司、奥田健介
2. 発表標題 Fluorescent analyses of biomolecules and metals through signal amplification system
3. 学会等名 第13回エネルギー理工学研究所国際シンポジウム（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北西悟司、高木 晃、高嶋一平、大橋憲太郎、奥田健介
2. 発表標題 がん微小環境を標的とする4-フェニル酪酸バイオアイソスターの創薬化学研究
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高木 晃、重松春花、高嶋一平、奥田健介
2. 発表標題 -ケトエステル型ヒドラジン検出蛍光プローブの創製
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高嶋一平、三浦佑介、田島名菜、松本信之、高木 晃、奥田健介
2. 発表標題 生体内金属による触媒回転を応用したシグナル増強型蛍光プローブの開発 新たなセンシング機構による微量金属の高感度検出
3. 学会等名 第71回日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 臼口和希, 高木 晃, 高嶋一平, 奥田健介
2. 発表標題 栄養飢餓耐性を解除する(±)-Uvaridacol L の全合成と合成類縁体の活性評価
3. 学会等名 第63回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ippei Takashima, Yusuke Miura, Eiji Nakata, Akira Takagi, and Kensuke Okuda
2. 発表標題 Fluorescent analyses of metals using cephem compound
3. 学会等名 the 12th International Symposium of Advanced Energy Science (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高嶋一平, 井上陽平, 松本信之, 高木 晃, 奥田健介
2. 発表標題 亜鉛触媒反応を応用した細胞内亜鉛イオンの高感度検出プローブの開発
3. 学会等名 第22回日本亜鉛栄養治療研究会学術集会(オンライン)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北西悟司, 高木 晃, 高嶋一平, 大橋憲太郎, 奥田健介
2. 発表標題 栄養飢餓耐性を解除するアリーリデン・ヘテロ環関連化合物の創薬化学研究
3. 学会等名 第72回日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 白口和希、高木 晃、奥田健介
2. 発表標題 栄養飢餓耐性を解除するuvaridacol Lを起点とした低栄養選択毒性化合物の創製
3. 学会等名 第72回日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高木 晃、白口和希、高嶋一平、奥田健介
2. 発表標題 栄養飢餓耐性解除能を有するグルコース誘導体の開発
3. 学会等名 第23回菅原・大西記念癌治療増感シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高木 晃、北西悟司、大橋憲太郎、奥田健介
2. 発表標題 がんの栄養飢餓耐性を解除するアリーリデン・チアゾリジンジオン誘導体の開発
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 白口和希、高木 晃、奥田健介
2. 発表標題 無保護グルコースの2,6位選択的ジアシル化法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮坂和真、白口和希、高木 晃、奥田健介
2. 発表標題 無保護グルコースの 1,6位選択的ジアシル化法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 池永千裕、高木 晃、高嶋一平、奥田健介
2. 発表標題 亜鉛触媒反応を応用した亜鉛イオンの 19F-MRI プローブ分子の開発研究
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高木 晃、北西悟司、大橋憲太郎、奥田健介
2. 発表標題 がんの栄養飢餓耐性解除能を有するアリーリデン・チアゾリジンジオン誘導体の構造活性相関研究
3. 学会等名 第26回癌治療増感研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 白口和希、高木 晃、奥田健介
2. 発表標題 アノマー位水酸基を反応配向基として活用するグルコースの位置選択的修飾法の開発
3. 学会等名 第39回有機合成化学セミナー
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 白口和希、高木 晃、奥田健介
2. 発表標題 がん微小環境でのがん細胞の適応応答を標的とする -1,3,6-トリベンゾイルグルコースの開発
3. 学会等名 第73回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高木 晃、白口和希、奥田健介
2. 発表標題 アノマー位水酸基を配向基とするグルコースの選択的アシル化反応の開発
3. 学会等名 第49回反応と合成の進歩シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 白口和希、高木 晃、奥田健介
2. 発表標題 -グルコースを基質とした位置選択的アシル化
3. 学会等名 第49回反応と合成の進歩シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 白口和希、高木 晃、奥田健介
2. 発表標題 グルコース誘導体の効率的合成に資する位置選択的アシル化反応の開発
3. 学会等名 第40回メディシナルケミストリーシンポジウム
4. 発表年 2023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	奥田 健介 (Okuda Kensuke) (00311796)	神戸薬科大学・薬学部・教授 (34512)	

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
---------	---------