

令和元年6月24日現在

機関番号：34414

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07876

研究課題名(和文)非対称ジアリールメチレン構造を有するイミダゾリノン類の合成とその蛍光特性の評価

研究課題名(英文) Synthesis and fluorescence properties of imidazolinone analogs equipping an asymmetric diarylmethylene moiety

研究代表者

池尻 昌宏 (Ikejiri, Masahiro)

大阪大谷大学・薬学部・准教授

研究者番号：00412396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：非対称なジアリールメチレン構造を有するイミダゾリノン誘導体geo-DAINを設計し、その合成と蛍光特性を評価した。Geo-DAINは緑色蛍光タンパク質の発色団構造をモデルとした蛍光低分子であり、E,Z-幾何異性が存在する。Geo-DAINの合成は、イミデートとイミノエステルとの縮合反応を用いて実施した。Geo-DAINの光学特性として、波長の異なる光の照射によって、E,Z-異性体間での可逆的な変換が可能であり、また、粉末状態や凍結溶液状態において異なる色の蛍光を発することが判明した。本特性は2種の蛍光ON構造を有する蛍光スイッチ分子の開発に繋がる結果であり、その応用に期待がもたれる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

スイッチ機能を有する蛍光分子の開発は、蛍光イメージング技術の発展における極めて重要な要素であり、生命科学や医療診断技術に大きな貢献をもたらす。特に既存のものとは異なった特性をもつ蛍光分子においては、これまで不可能であったイメージングを実現可能にする期待も持たれる。本研究成果はまだ初期的な段階であるため、そのような実践的な段階には達していないが、蛍光スイッチ機能の特性は新しい発想によるものであり、今後、発展できる十分なポテンシャルを持っている。将来的には蛍光イメージング技術の発展へと繋げていきたい。

研究成果の概要(英文)：Imidazolinone analogs, geo-DAIN, having an asymmetric diarylmethylene moiety were designed and synthesized. Geo-DAIN is a green fluorescent protein chromophore analog and afforded E, Z-geometrical isomers. The geo-DAIN synthesis was performed by a condensation reaction with imidate and imino-ester. Both isomers of geo-DAIN were reversibly transformed each other by irradiation with different wavelength light. In addition, both isomers afforded different color emission between E and Z form at a powder state and a frozen solution. Such properties could apply for a fluorescence turn-on system that affords dual emission.

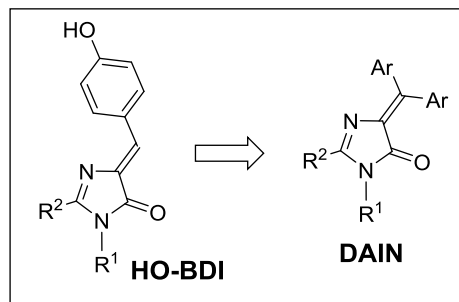
研究分野：有機化学

キーワード：蛍光分子 クロモフォア 緑色蛍光タンパク質 複素環合成

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

蛍光物質をプローブ (検出試薬) に用いた蛍光イメージングは、生体分子の挙動を視覚的かつリアルタイムに観察することができるため、生命科学の研究における必要不可欠な手段となっている。この蛍光プローブを設計する上でのポイントとなるのが、必要な状況で蛍光 ON となり、不要な状況で OFF となること。即ち、スイッチ ON/OFF の機能である。これにより目的物のみを選択的に可視化することが可能となる。このスイッチ機能の例として、光誘起電子移動 (PeT) や蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 等があり、これらを利用した多くの蛍光プローブが開発されている。しかしながら、様々な環境下での蛍光プローブの使用を想定した場合、様々なスイッチ機能の開発が必要となる。このような背景のもと申請者は、新たなスイッチ機能の開発を目指し、GFP の蛍光発色団 (クロモファー) として知られる p-hydroxybenzylideneimidazolinone (HO-BDI) 構造をモデルとした新規蛍光物質の開発を以前から進めていた。特にそのベンジリデン構造をジアリールメチレン構造に変えた類縁体: diarylmethyleneimidazolinone (DAIN) においては、コンホメーションの固定化が蛍光のスイッチ OFF/ON 機能を担うことを見出しており、環境応答性蛍光分子としての種々の開発研究を進めている段階であった。



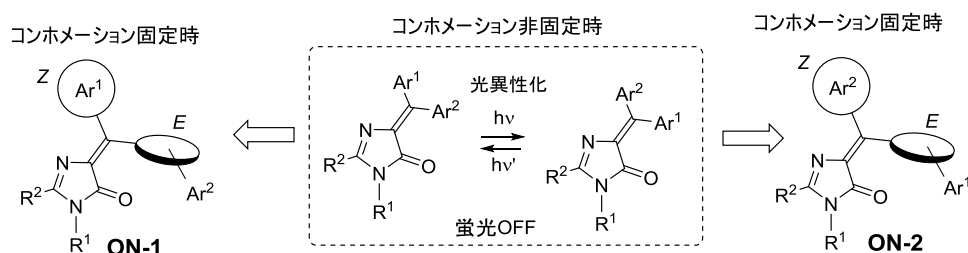
2. 研究の目的

上記の DAIN においては蛍光スイッチ機能を有するものの、OFF/ON の変化しか与えないため、その応用には限りがみられていた。そこで今回の研究では、OFF/ON-1/ON-2 のスイッチ機能、すなわち、ON の状態においても 2 色の発光パターン (ON-1 発光、ON-2 発光) を有する新規 DAIN 分子の開発を目指した。これにより、DAIN 分子のより多方面、多目的での活用が期待できる。

3. 研究の方法

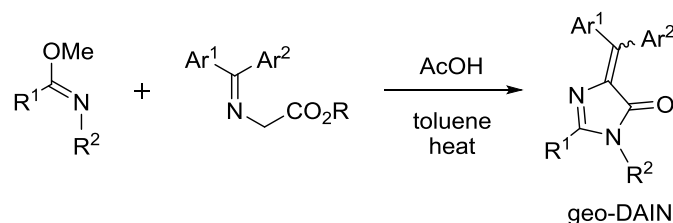
1) OFF/ON-1/ON-2 型スイッチ分子の設計

2 色の発光パターンを持つ分子のデザインとして、DAIN 分子の光 *E*, *Z* 異性化能に着目した。すなわち、これまでの DAIN 分子の設計においては、ジアリール部位に同じ芳香環を採用していたが、この芳香環に異なる 2 種 (Ar¹, Ar²) を用いることでその幾何異性が生じ、かつ光 *E*, *Z* 異性化反応をコントロールすることで、可逆的に 2 種の DAIN 分子を形成することが可能になる。特にその芳香環に電子密度の異なる 2 種を用いることで *E*, *Z* 異性体間での HOMO-LUMO ギャップの差異が想定され、それによって *E*, *Z* 異性体間での異なる蛍光色 (ON-1 発光、ON-2 発光) が期待できる。よって今回の研究では、このような幾何異性型 DAIN (geo-DAIN) の開発を研究対象とした。



2) Geo-DAIN 分子の合成法

Geo-DAIN 分子の合成には申請者らが見出した縮合反応 (DAIN 構築反応) を用いた。本反応は、イミノエステルとイミデートが酢酸条件下にて転位を伴いながら反応することで、目的物を 1 工程で与える効果的な手法であり、geo-DAIN の合成にも適用可能であった。



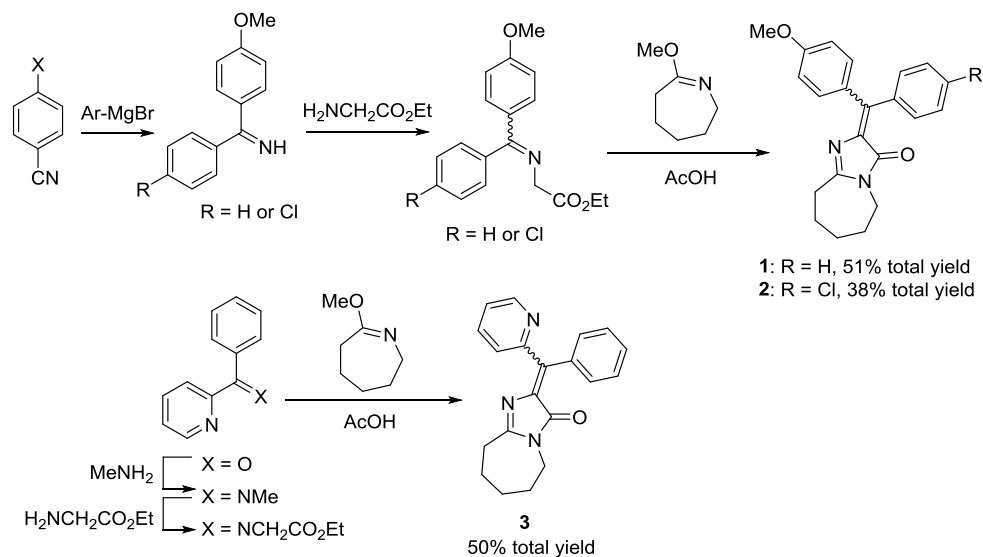
3) 蛍光特性の評価

蛍光特性の評価には蛍光光度計によるスペクトル測定を行った。

4. 研究成果

1) Geo-DAIN (第 I 世代) の開発

Geo-DAIN の具体例として、ジアリール部の電子密度の異なる 3 種のアナログ **1**~**3** を合成した。いずれも DAIN 構築反応を用いることで、まずまずの収率にて合成に成功した。なお構造決定については、 $^1\text{H-NMR}$ と UV-vis スペクトルの実測値と DFT 計算値との比較により合理的に決定した。



Geo-DAIN**1**~**3** の光異性化反応について検討したところ、想定どおり照射波長を変えることにより (UV 光と青色光)、*E-Z* 異性体間の変換が 2:1 程度のジアステレオ選択性にて可逆的に可能であることが判明した。また、**3** においてはピリジン窒素とイミダゾリノン窒素間での亜鉛イオンによるキレートが可能な構造であり、*Z*-体ではキレート ON、*E*-体ではキレート OFF であることが $^1\text{H-NMR}$ と UV-vis スペクトルから確認できた ($K_{\text{ass}} = 1.72 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$)。なお、*Z*-体においては、キレートによるコンホメーション固定によって蛍光 ON へのスイッチが期待されたが、予想に反して無蛍光であった。

次に、**1**~**3** の蛍光を測定した。今回はコンホメーションの固定環境として、粉末状態での発光 (aggregation induced emission, AIE) と凍結溶液での発光を評価した。その結果、**1**~**3** のいずれにおいても *E-Z* 異性体間での異なる蛍光色を示し、想定していた 2 種の蛍光 ON 状態 ON-1/ON-2 が確認できた。なお、凍結前の溶液状態では無蛍光であった。

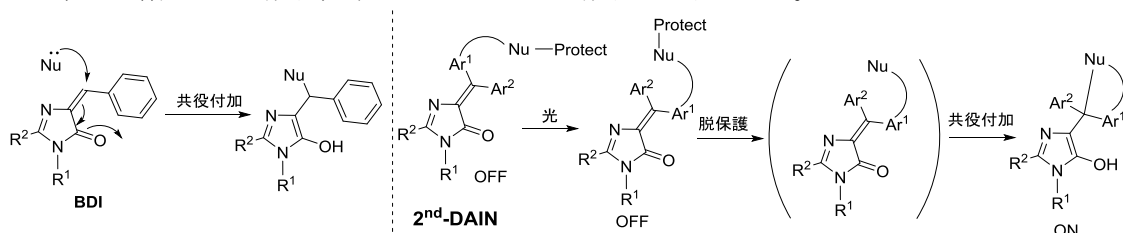
粉末状態での蛍光波長 (nm) と目視での観察色

Geo-DAIN	<i>Z</i> -体	<i>E</i> -体
1	476 (青)	521 (黄緑)
2	497 (シアン)	501 (青緑)
3	514 (黄緑)	496 (シアン)

以上の結果から、溶液状態では蛍光 OFF、コンホメーション固定時 (粉末あるいは凍結溶液) では 2 種の蛍光パターン (ON-1/ON-2) を示す当初の想定通りの結果が得られ、目的は達成されたといえる。しかしながら、コンホメーション固定時の状態が粉末あるいは凍結溶液に限定され、先に示したようにキレーション状態では蛍光 ON にはならなかった。これは、geo-DAIN の適用範囲が限定されることを示しており、第 II 世代の設計へとシフトチェンジすることにした。

2) Geo-DAIN (第 II 世代) の開発

第 II 世代の設計には、BDI 構造の共役付加反応を鍵反応に用いた。即ち、共役付加反応の前後にて蛍光の OFF/ON をコントロールする狙いがある。本設計は OFF/ON-1/ON-2 機能ではなく、2 段階の OFF 機能、即ち OFF/OFF/ON 機能が可能となる。



第Ⅱ世代の合成においてまずは常法の DAIN 構築反応を行ったが、ジアリール部の立体障害のためか、反応が進行しなかった。そこで新たな DAIN 合成法を検討したところ、3,5-ジヒドロ-4*H*-イミダゾ-4-オン体とジアリルメタンイミン体との縮合が低収率ながらも進行することを見出した。よって本反応を用いることで、第Ⅱ世代型 geo-DAIN の合成を達成できたが、予想に反し、狙いの共役付加反応が進行しなかった。現時点では、求核部位の見直しの段階となっている。また対照実験として、DAIN 構造ではなく BDI 構造を用いての OFF/OFF/ON 機能の検討も進めている段階である。

3) 総括

上記のように、本研究の当初の目的はある程度達成できたといえる。特に第Ⅰ世代 geo-DAIN においては、有機化学分野での著名な学術誌にも掲載され、いくつかの引用も得ている。一方、第Ⅱ世代 geo-DAIN においては、開発途中での期間終了となった。しかしながら、その中でも新たな DAIN 合成法の発見など多くの知見を得ることができた。今後も本研究を継続していきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

Ikejiri, M.; Kojima, H.; Fugono, Y.; Fujisaka, A.; Chihara, Y.; Miyashita, K.
Synthesis and properties of geometrical 4-diarylmethylene analogs of the green fluorescent protein chromophore
Org. Biomol. Chem., **2018**, *16*, 2397–2401.
DOI: 10.1039/C8OB00208H

[学会発表] (計1件)

池尻昌宏・小嶋春花・畚野優実・藤坂朱紀・千原佳子・宮下和之
*E/Z*異性を有するジアリールメチレン型 GFP 蛍光発色団アナログの合成とその光物理・光化学特性
第48回複素環化学討論会(長崎)2018年

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：宮下 和之

ローマ字氏名：Kazuyuki Miyashita

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。