

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：82108

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K06850

研究課題名(和文) 外部環境変化に迅速に反応する高輝度水溶性色素の開発に関する研究

研究課題名(英文) Research on highly-luminous, water-soluble dyes with rapid response against external environmental changes

研究代表者

砂金 宏明 (ISAGO, Hiroaki)

国立研究開発法人物質・材料研究機構・エネルギー・環境材料研究拠点・主幹研究員

研究者番号：40343850

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：生体組織深部における分子イメージングを可能にする目的で、外部刺激に応じて深赤～近赤外域(650-900 nm)に高い輝度(モル吸光係数と蛍光収率の積)の蛍光を発する水溶性化学プローブの開発を行った。当該研究助成によって得られた成果は大きく2つに集約され、一つはpHに迅速に反応し、可逆的に蛍光特性が変化する(酸性では見かけ上消光する)リンのフタロシアニン(Pc)錯体の開発であり、もう一つはバイオチオール(システインやグルタチオン等)と反応し、迅速かつ定量的に赤い蛍光を発する高原子価銀のPc錯体の開発である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当該研究成果の意義は、外部環境に応じて速やかに発光或いは発光/消光する水溶性フタロシアニン(Pc)色素を開発したことにある。本研究で取り扱ったPcは赤い蛍光(発光極大波長700nm付近)を発するため、生体の他の組織(筋肉・血液等)による吸収や発光に妨害を受けることが少なく、緑色光を用いるが故に小動物や表層組織に限られた従来のイメージングを大型動物や組織深部への発展を可能とし、チオールと迅速かつ定量的に反応する銀錯体やpHによって可逆的に発光・消光するリンの錯体は、アルツハイマー病の予防・治療や癌の蛍光診断の実現と普及に貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Noble water-soluble chemical probes that emit deep-red/near-infrared light (650-900 nm) with high brightness (the product of molar extinction constant and fluorescence quantum yield) in response to external stimuli have been developed to engage deep-tissue molecular imaging. This study has elucidated the following findings. Firstly, a phosphorous-phthalocyanine complex rapidly pH-responsive that reversibly changes its fluorescence characteristics (the optical emission looks disappeared under acidic conditions) has been synthesized. Secondly, water-soluble phthalocyanine complexes of silver in a high oxidation state (+2) emit intense red fluorescence upon rapid and quantitative reaction with biothiols such as cysteine and glutathione.

研究分野：錯体化学

キーワード：分子スイッチ 蛍光プローブ 化学プローブ フタロシアニン 水溶性 高原子価銀 リン

1. 研究開始当初の背景

小分子蛍光体は、生物科学やバイオテクノロジーの分野において生体分子のラベル化、環境指標試薬（pH 指示薬等）等のイメージング試薬として重要である¹⁾。最も注目の話題の一つに蛍光試薬を用いた癌診断（photodynamic diagnosis; PDD）がある。

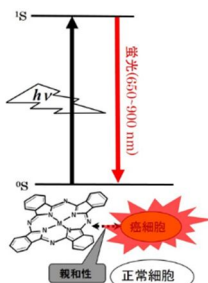


図 1. PDD の概念

PDD とは、癌細胞と親和性の高い蛍光体を体内に送り込み、適当な光源により励起し、癌細胞だけを発光させる（図 1）ことで患部を特定する診断法である²⁻⁴⁾。特に目標との迅速な相互作用によって発光特性が異なれば、より明瞭なコントラストが得られる（化学プローブ）。図 2 に主要な蛍光体の光吸収極大波長と輝度を示す。従来 PDD には fluorescein 系色素（図 2 中色素 17、18）等の緑色蛍光が用いられてきたが、肉眼に最も映えるためである。緑色光はマウス等の小動物或いは表層の腫瘍には効果的だが、生体内には血液やメラニン等可視光を吸収する物質が数多く存在するため（図 3）、組織深部では浸透性に乏しいことが問題となる⁵⁻⁷⁾。またこれらの物質も入射光によって励起され発光（自家蛍光）するため、患部からの信号観測の妨げとなる⁵⁻⁷⁾。血液や水等の干渉を最小限とする目的で、深赤～近赤外の光（650-900 nm; 生体の窓）に高輝度を有する蛍光色素が注目されている³⁻⁷⁾。その様な蛍光体として cyanine 系色素（図 2 中色素 27,28）が知られるが、fluorescein 系色素より輝度が劣る。生体の窓に強い光吸収（ $\epsilon > 10^5$ ）と蛍光を示す色素としてフタロシアニン（Pc；図 1 にその構造を、図 3 に吸収（黒実線）及び蛍光（破線）スペクトル⁸⁾を記載）が知られているが、一般に Pc は水に不溶であり、水溶化しても水中で強く会合する⁹⁾。会合現象は Pc の励起状態を著しく短命化し、発光せず迅速に基底状態への緩和（無輻射遷移）を招くため¹⁰⁾、イメージングにおいて深刻な問題となる。図 2 中 Pc 系色素 29 は、分子平面に垂直に導入した高高い親水性置換基（軸配位子）の存在により水中で会合にくい稀有な例であるが、軸配位子に水溶性と会合抑制の両方の役割を担わせているために、fluorophore 近傍に外部環境変化に鋭敏な官能基を導入できない（化学プローブに適さない）のが難点である。

そこで本課題では、Pc 平面上の周辺置換基に水溶性を、軸配位子に会合の抑制と外部環境への応答を分担させることを提案する。申請者らは、高い水溶性のアンチモン Pc 錯体（図 4）において、周辺置換基が水溶性を高め、軸配位子と水分子との相互作用が錯体同士の会合を抑制する（図 5）ことを報告してきた⁸⁾。また同じ 15 族元素であるリンの Pc 錯体が高い σ 値を示し¹¹⁾、かつ迅速に酸・塩基と反応し、分光特性が著しく変化することも見出ししてきた。以上の知見と実績を踏まえて、上記水溶性アンチモン錯体とリン錯体の特性を組み合わせることにより前述の問題を解決できると考え、本研究課題を提案した。

そこで本課題では、Pc 平面上の周辺置換基に水溶性を、軸配位子に会合の抑制と外部環境への応答を分担させることを提案する。申請者らは、高い水溶性のアンチモン Pc 錯体（図 4）において、周辺置換基が水溶性を高め、軸配位子と水分子との相互作用が錯体同士の会合を抑制する（図 5）ことを報告してきた⁸⁾。また同じ 15 族元素であるリンの Pc 錯体が高い σ 値を示し¹¹⁾、かつ迅速に酸・塩基と反応し、分光特性が著しく変化することも見出ししてきた。以上の知見と実績を踏まえて、上記水溶性アンチモン錯体とリン錯体の特性を組み合わせることにより前述の問題を解決できると考え、本研究課題を提案した。

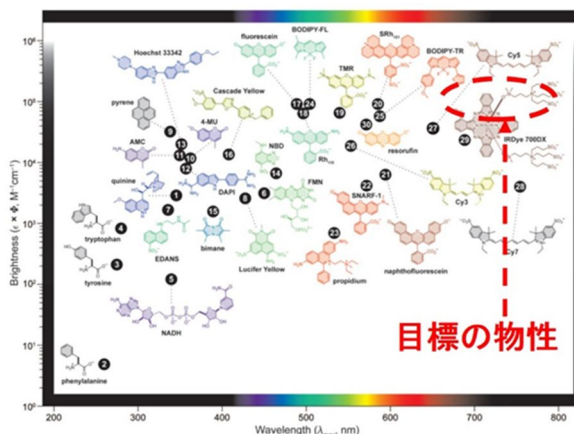


図 2. 主要蛍光色素の輝度 vs. 吸収極大波長¹⁾

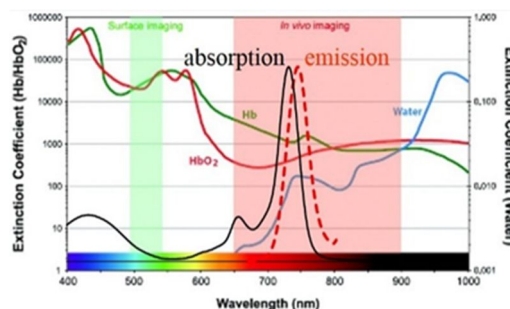


図 3. 生体の窓⁵⁾と Pc の吸光・発光⁸⁾

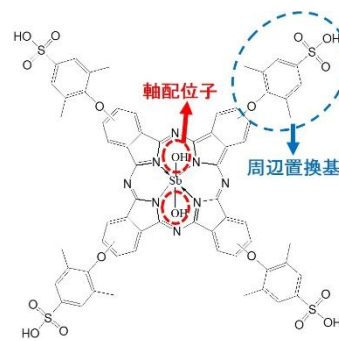


図 4. 水溶性アンチモン錯体⁸⁾

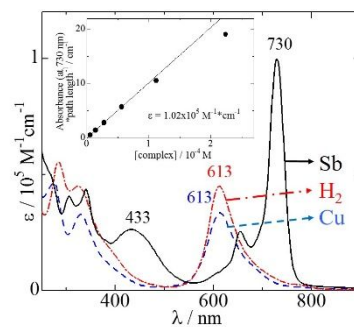


図 5. 水溶性アンチモン錯体の光吸収スペクトル（水中）⁸⁾

文献

- 1) Lavis and Raines, ACS Chem. Biol., 3 (2008) 142, 2) Kostenich 他、Lung Cancer, 50 (2005), 319, 3) Vahrmeijer 他、Nature Rev. Clin. Oncol., 10 (2013) 507, 4) Gioux 他、Mol. Imaging, 9 (2010) 237, 5) H. Kobayashi 他、Chem. Rev., 110 (2010) 2620, 6) V. J. Pansare 他、Chem. Mater., 24 (2012) 812, 7) R. Bonnett, Chem. Soc. Rev. 24 (1995) 19, 8) 砂金他、J. Inorg. Biochem., 117 (2012) 111, 9) Dumoulin 他、Coord. Chem. Rev., 254 (2010) 2792, 10) Howe 他、J. Phys. Chem. A, 101 (1997) 3213, 11) 砂金他、J. Porphyrins Phthalocyanines, 117 (2013) 763.

2. 研究の目的

生体組織深部における分子イメージングを可能にするため、深赤～近赤外域（650-900 nm）に高い輝度（モル吸光係数 ϵ と蛍光収率 Φ の積）の蛍光を発する水溶性化学プローブを開発することを目的とする。この波長領域に強い光吸収と蛍光を示す新規 Pc 系蛍光色素（一般に水に不溶で会合しやすい）を開発する。酸・塩基と迅速に反応するリン錯体や硫黄と強い親和性を持つ銀イオンの特性を利用し、化学プローブとしての可能性を検討する。この研究の成果は、緑色光を用いるが故に小動物や表層組織に限られた従来のイメージングを大型動物や組織深部への発展を可能とし、癌の蛍光診断の実現と普及に貢献すると期待される。

3. 研究の方法

本研究課題は以下の二項目、(1) 水溶性 Pc 錯体の合成、(2) 水溶液中における分光特性および会合挙動の把握ならびに化学応答（化学プローブ）特性の評価、からなる。また本課題で取り扱う水溶性 Pc 錯体は、親水性周辺置換基としてスルホン酸を含むアニオン系リン錯体と、ピリジニウムを含むカチオン系銀錯体の二系統に絞った。

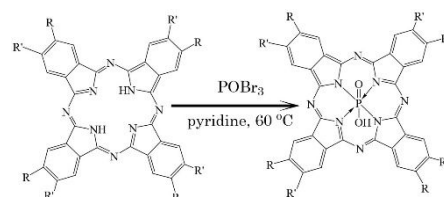


図 6. リン錯体の合成スキーム

(1) 合成

前駆体 Pc の合成

Pc 無金属体¹²⁾とオキソ臭化リンから前駆体となる五価リンの Pc 錯体を合成した（図 6：砂金他、J. Inorg. Biochem., 180 (2018) 222-229）。また既知の方法¹³⁾に従い、チオキシピリジン置換 Pc 無金属体と硝酸銀から二価銀の錯体を合成した（図 7）。

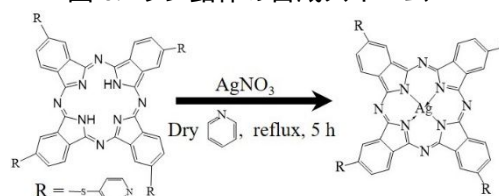
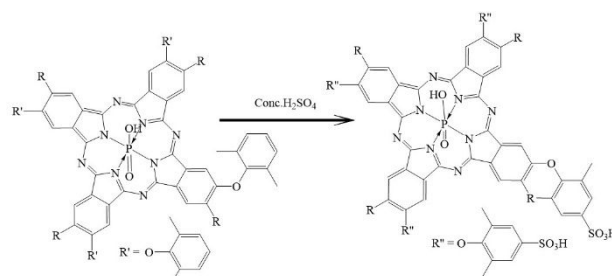


図 7. 銀錯体の合成スキーム

Pc 錯体の水溶化

アニオン系錯体については、既知の方法に従い¹¹⁾、上記リン錯体の周辺置換基に親水基を導入し（図 8）、水溶化した（投稿準備中）。カチオン系錯体では、ピリジン末端を Meerwine 試薬により四級化した。



(2) 各種特性の評価

新規化合物については、質量分析、元素分析等により同定した。分光特性ならびに会合特性評価錯体の水溶液中における分光（光吸収・発光）測定を種々の濃度で行い、会合挙動を調べた。会合が著しい場合¹⁴⁻¹⁸⁾は、界面活性剤や共溶媒等を添加し、単量体だけが存在する条件

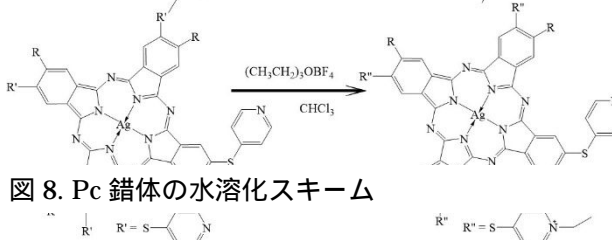


図 8. Pc 錯体の水溶化スキーム

を把握した。また単量体としての光吸収・発光特性を評価し、吸光度の濃度勾配から ϵ 値を、また希薄溶液における蛍光強度を標準物質と比較して Φ 値をそれぞれ決定した。

水溶液中で酸・アルカリ（リン錯体の場合）或いはチオール（銀錯体の場合）との反応に伴う分光特性の変化を調べた。

文献

12) 砂金他、Dyes Pigment, 88 (2011) 187, 13) T. T. Tasso 他、Dalton Trans., 43 (2014) 5886, 14) 砂金他、Bull. Chem. Soc. Jpn, 67 (1994) 383, 15) 砂金、Chem. Commun., (2003)1864, 16) 砂金他、Chem. Lett., 33 (2004) 862, 17) 砂金他、Inorg. Chem., 51 (2012) 8447, 18) 砂金、"Optical spectra of Phthalocyanines and Related Compounds", Ch.3, Springer, Tokyo (2015).

4. 研究成果

当該研究課題により、以下の 2 つの成果が得られた。

(1) 水溶液中で pH に迅速に応答し、分光特性(光吸収・発光)を変える五価リンの水溶性 Pc 錯体を開発し、赤色 turn-on/turn-off 蛍光プローブとして有望であることを見出した(投稿準備中)。

アニオン系 Pc 配位子(図 8 上)の五価リン錯体の輝度($\epsilon / 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \times \Phi$)は、中性、酸性、アルカリ性溶液中でそれぞれ(1.4 x 0.33)、(0.8 x 0.08)、(2.6 x 0.46)であり、図 2 で目指した数値を満足するだけでなく、反応前後の顕著なコントラスト(図 9)と迅速な応答(プロトン移動であるため反応は非常に速い)は蛍光プローブに要求される条件を満たしている。さらに冒頭に示した通り、生体の窓領域における発光であるため、組織深部での分子イメージングを容易にすると期待される。

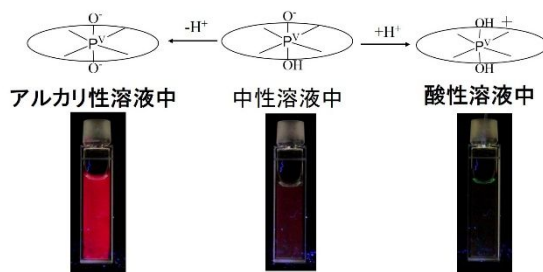


図 9. 五価リン Pc 錯体の蛍光特性の液性依存性：楕円は Pc 配位子を表す。

(2) 水溶液中でバイオチオール(システインやグルタチオン)と迅速、定量的、高感度かつ選択的に反応し、強い赤色蛍光を発する二価銀の水溶性 Pc 錯体を開発し、赤色 turn-on 蛍光プローブとして有望であることを見出した。バイオチオールは生体系のレドックス均衡に重要な役割を果たしており、その高感度検出は、アルツハイマー病等の神経変性疾患の検査や予防に貢献すると期待される。この成果は Inorg. Chem., 60 (2021) 6739-6745 に掲載された。

この銀錯体はアラニンやヒスチジン等の非チオールアミノ酸は言うまでもなく、硫黄を含むメチオニンやシスチンとも反応しない。またアミノ酸以外でも、2-メルカプトエタンスルホン酸ナトリウム(MESNA)や3-メルカプト-1, 2-プロパンジオール等の-SH 基を有する化合物と選択的に反応する(図 10)。

二価銀 Pc 錯体室温では蛍光を示さないが、還元を受けると銀イオンが Pc 配位子から脱離し、高輝度の無金属 Pc が遊離することで説明される(砂金他, J. Inorg. Biochem. 219 (2021) 111427; doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2021.111427)。二価銀 Pc 錯体は有機溶媒中ではチオールとは反応しないが、水溶化することでチオールと反応する。

このピリジルチオ置換 Pc は本来カチオン系リン錯体合成用に準備したが、予想に反してリン錯体は得られずに未知の不溶物が生成した。後処理に銀塩を用いたところ偶然に二価銀の錯体が得られ、二価銀の潜在的な酸化力と銀と硫黄との強い親和性に基づき、銀 Pc 錯体のチオールセンサーとしての可能性に思い至る端緒となった。

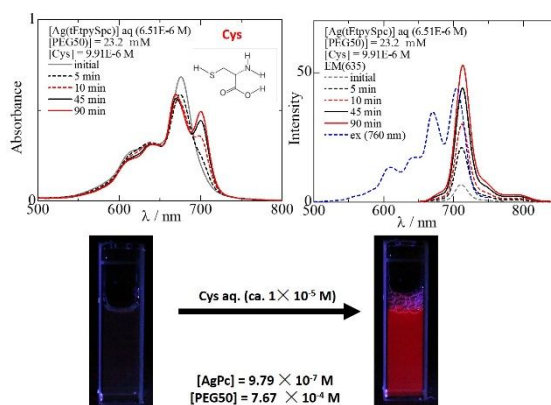


図 10. 二価銀 Pc 錯体とシステインとの反応における吸収・蛍光スペクトル変化。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Ghosh Avijit, Yoshida Manabu, Suemori Kouji, Isago Hiroaki, Kobayashi Nagao, Mizutani Yasuhisa, Kurashige Yuki, Kawamura Izuru, Nirei Masami, Yamamuro Osamu, Takaya Tomohisa, Iwata Koichi, Saeki Akinori, Nagura Kazuhiko, Ishihara Shinsuke, Nakanishi Takashi	4. 巻 10
2. 論文標題 Soft chromophore featured liquid porphyrins and their utilization toward liquid electret applications	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-12249-8	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 Isago Hiroaki, Fujita Harumi, Sugimori Tamotsu	4. 巻 180
2. 論文標題 Amphoteric phosphorous(V)-phthalocyanines as proton-driven switchable fluorescers toward deep-tissue bio-imaging	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Inorganic Biochemistry	6. 最初と最後の頁 222 ~ 229
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jinorgbio.2017.12.014	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 Isago Hiroaki, Fujita Harumi	4. 巻 22
2. 論文標題 Solvent effects on molecular aggregation of highly water-soluble phthalocyanines	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Porphyrins and Phthalocyanines	6. 最初と最後の頁 102 ~ 111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1142/S1088424618500141	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 Sugaya Tomoaki, Fujihara Takashi, Naka Takashi, Furubayashi Takao, Matsushita Akiyuki, Isago Hiroaki, Nagasawa Akira	4. 巻 24
2. 論文標題 Observation of the First Spin Crossover in an Iron(II) Complex with an S6 Coordination Environment: Tris[bis(N,N-diethylamino)carbeniumdithiocarboxylato]iron(II) Hexafluorophosphate	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chemistry A European Journal	6. 最初と最後の頁 17955 ~ 17963
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.201803330	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 Isago Hiroaki, Fujita Harumi, Nakai Suzuko, Sugimori Tamotsu	4. 巻 219
2. 論文標題 Spectral investigation of phthalocyanine complexes of high-valence silver and their aggregates	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Inorganic Biochemistry	6. 最初と最後の頁 111427 ~ 111427
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jinorgbio.2021.111427	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 Isago Hiroaki, Fujita Harumi, Nakai Suzuko, Sugimori Tamotsu	4. 巻 60
2. 論文標題 Syntheses of Water-Soluble Silver(II)-Phthalocyanines toward Optical Sensing for Thiol Detection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Inorganic Chemistry	6. 最初と最後の頁 6739 ~ 6745
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.inorgchem.1c00567	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11件(うち招待講演 1件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Hiroaki Isago, Harumi Fujita, Tamotsu Sugimori
2. 発表標題 Syntheses and spectral investigation of water-soluble silver(II)-phthalocyanine complexes
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroaki Isago, Harumi Fujita, Suzuko Nakai, and Tamotsu Sugimori
2. 発表標題 Syntheses and Spectral Investigation of Phthalocyanine Complexes of Silver in Higher Oxidation States
3. 学会等名 第69回錯体化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroaki Isago, Harumi Fujita, Suzuko Nakai, and Tamotsu Sugimori
2. 発表標題 Spectral Investigation of Phthalocyanine Complexes of High-Valence Silver and their Aggregates
3. 学会等名 CEMS International Symposium on Supramolecular Chemistry and Functional Materials (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H. Isago, H. Fujita, T. Sugimori
2. 発表標題 Study on syntheses of silver(II)-phthalocyanines and effects of molecular aggregation on their spectral properties
3. 学会等名 日本化学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 砂金宏明, 藤田晴美, 杉森保
2. 発表標題 銀フタロシアニン錯体の酸化ならびに生成物の分光学的性質
3. 学会等名 日本化学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 砂金宏明, 藤田晴美, 杉森保
2. 発表標題 スメクタイトに吸着した銀フタロシアニン錯体の水溶液中における分光学的性質
3. 学会等名 日本化学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroaki Isago, Harumi Fujita, Tamotsu Sugimori
2. 発表標題 Phosphorous-Phthalocyanines as Amphoteric Phosphors
3. 学会等名 6th Georgian Bay International Conference on Bioinorganic Chemistry (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 砂金宏明、藤田晴美、杉森保
2. 発表標題 三価アンチモン-フタロシアニン錯体と銀塩の反応
3. 学会等名 錯体化学討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 砂金宏明、藤田晴美、中居寿々子、杉森保
2. 発表標題 Study on Syntheses of Silver(II)-Phthalocyanines and Effects of Molecular Aggregation on their Spectral Properties
3. 学会等名 日本化学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroaki Isago, Harumi Fujita, Tamotsu Sugimori
2. 発表標題 Water-soluble Silver(II)-Phthalocyanines toward Fluorescence Sensing of Biothiols
3. 学会等名 錯体化学会第70回討論会 (国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroaki Isago, Harumi Fujita, Suzuko Nakai, Tamotsu Sugimori
2. 発表標題 Water-soluble Silver(II)-Phthalocyanines toward Fluorescence Sensing of Biothiols. Part 2
3. 学会等名 日本化学会第101回春季年会（国際学会）（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究成果を2020年12月に開催予定の環太平洋化学会議（Pacifichem）で公開する目的で期間延長をさせて頂いたが、COVID-19の影響で延期されたために参加できなかったことは遺憾の極みであった。その一方で、期間延長の間に、カチオン型銀錯体がバイオチオール蛍光プローブとして作用することを見いだせたことは、たとえ偶然とは言え幸運なことであった。

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

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