

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08211

研究課題名(和文) 単一分子RGB蛍光団を用いたライブセル・フルカラーマッピング計測技術の開発

研究課題名(英文) Development of live cell full-color mapping measurement by using RGB fluorophore in a single molecule

研究代表者

神野 伸一郎 (Kamino, Shinichiro)

愛知学院大学・薬学部・教授

研究者番号：20537237

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)：研究代表者は、ローダミンが二分子縮合したアミノベンゾピラノキサントン系(ABPX)色素を母核としたアクチベータブル分子の創出に取り組んできた。本研究を通じて以下の3つの新たな成果を得ることができた。[1]pHにより構造と色が2段階に変化するアクチベータブル分子の開発、[2]光と化学的刺激に対し蛍光色が2段階に変化するアクチベータブル分子の開発、[3]可視域から近赤外域に蛍光波長が切り替わる新規縮環型シアニン系色素の合成

研究成果の学術的意義や社会的意義

外部刺激に応答して、分子構造と色が2段階に変化するABPXの特徴は、刺激の強さや観測対象となる物質の濃度に応じて、波長が変化するアクチベータブル分子となり、ライフサイエンス、環境や衛生化学などの分野に資する分析・計測技術となる。今後、発色団の誘導化を継続し、顕微鏡を必要としない新たなバイオイメーキング法の開発に繋げたい。また近赤外領域の光を発光する有機分子は、セキュリティ・インク、フォトリソグラフィや生体イメージングなど、幅広い分野で利用されている。本研究で見いだした縮合型シアニン系色素は、これら近赤外光技術を進展させ、機能性物質科学の発展に寄与できる成果となる。

研究成果の概要(英文)：We have been working on the development of activatable molecules based on aminobenzopyranoxanthene (ABPX) containing fused-rhodamines dyes. Through this project, we have succeeded in obtaining the three new results as shown below.

[1] Development of activatable molecules, the structure and color of which change in two steps in response to pH. [2] Development of activatable molecule which shows the stepwise structural and fluorescence color conversion based on light and acid stimulations.[3] Development of a new class of ring-fused cyanine dye, the fluorescence wavelength of which is switched from visible region to near infrared region

研究分野：物理有機化学

キーワード：キサントン系色素 ローダミン アクチベータブル分子 シアニン系色素 近赤外光

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

蛍光イメージングやケミカルセンシングは、外部刺激や環境変化にตอบสนองして発色や蛍光が変化するアクチベータブル分子を用いた分析・計測手法であり、発色団にはさまざまな有機色素が用いられている。しかしながら従来の色素分子は、単一波長の光シグナルしか表示することができない。研究代表者はこれまで、外部刺激や環境変化にตอบสนองして、構造と色が2段階に変化するアミノベンゾピラノキサンテン系 (ABPX) 色素を母核とした、新規アクチベータブル分子の開発に取り組んできた。一方、外部刺激の強さや環境変化の違いで、構造と光物性を、段階的に変化させる分子操作の構築には至っておらず、それが、本色素群を実用的なアクチベータブル分子として応用する上で課題となっていた。

2. 研究の目的

本課題では、ライフサイエンスや環境・衛生化学など、さまざま分野に応用可能な分析・計測技術の開発を目指し、外部刺激の強さや環境変化の違いを、フルカラーセンシングまたは蛍光イメージング可能な新規アクチベータブル分子の創出を目的とした。

3. 研究の方法

本課題では、ローダミンが二分子縮合した ABPX を母核とした新規アクチベータブル分子の創出を目指し、以下の2つのテーマについて取り組んだ。

[1] pHにより構造と色が2段階に変化するアクチベータブル分子の開発

[2] 光と化学的刺激に対し蛍光色が2段階に変化するアクチベータブル分子の開発

また本研究の過程で、シアニン系色素が縮環した骨格が生成する新反応を見だし、本化合物が近赤外吸収・蛍光特性をもつことを明らかにするなど、新たな研究への展開にも繋がることできた。

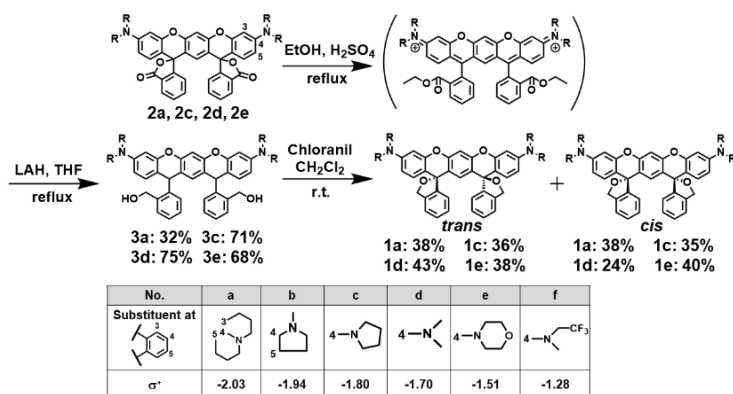
[3] 可視域から近赤外域に蛍光波長が切り替わる新規縮環型シアニン系色素の合成

4. 研究成果

[1] pHにより構造と色が2段階に変化するアクチベータブル分子の開発

観測したい pH で発色や蛍光などの光シグナルが OFF から ON へ変化するアクチベータブル分子は、生体内の標的組織や細胞の特異的な pH を認識して可視化する分子プローブとして利用されている。研究代表者らは、ABPX を母核構造とした pH センサーの開発に取り組む中で、スピロエーテル (SE) 環を有する ABPX-SE (**1**) が、pH にตอบสนองして構造と色が2段階に変化することを見出した¹。一方、pH による構造と色の段階的な制御はできておらず、連続した pH の変化 (pH 勾配) をセンシングできるアクチベータブル分子として応用する上で課題となっていた。そこで本研究では、pH に対する **1** の構造と SE 環の開閉環反応の関係の解明を目的とし、発色団のキサンテン環部位を構造改変した ABPX-SE 誘導体を合成し、pH 応答性について精査した。

プロトンの付加により SE 環が開環することで生成する有色のカチオン体の安定性が、キサンテン環の窒素部位の電子供与性に関与し、また電子供与性の大きさを変化させることでその開閉を制御できると考えた。本仮説を立証するため、ハメットの置換基定数 (σ^+) が異なる **a-f** の置換基をもつ ABPX-SE 誘導体 **1a-f** をデザイン、合成した (Scheme 1)。まず既知化合物の **2a, 2c, 2d, 2e** のスピロラクトン部位をエチルエステルへと変換した後、Lithium aluminium hydride (LAH) を用いて還元を行なった。続いて chloranil を用いて酸化することで、目的の開環体 **3a, 3c, 3d, 3e** を合成した (Scheme 1)。なお、**1b** と **1f** の合成は現在、検討中である。



Scheme 1. Synthetic route of ABPX-SE derivatives.

化合物 **1a**, **1c**, **1d**, **1e** の *trans* 体を 10% ジメチルスルホキシド (DMSO) 含有の緩衝液に溶解させ、pH に対する吸収スペクトルを測定した。その結果、いずれの化合物においても pH に応答して有色のモノカチオン体 (**M**) とジカチオン体 (**D**) が生成した。また、キサンテン環の窒素部位の σ^+ 値が最も負に小さいモルフォリンを置換基とする化合物 **1e_{trans}** は、他の化合物と比べて、広い pH 範囲で **M** の吸光度が増大し、**S** から **M**, **D** への段階的な平衡をより顕著に確認することができた (Fig. 1)。さらに、キサンテン環の窒素部位の σ^+ 値が最も負に大きい **1a_{trans}** は、他の化合物と比べてより広い pH 範囲で **D** を生成することがわかった。以上の結果より、キサンテン環の窒素部位の電子供与性が大きいと生成する有色のカチオン体が安定となるため、SE 環が開環する方向へ反応が進行する一方で、電子供与性が小さいと生成する有色のカチオン体が不安定であるため、閉環体が生成する方向へ反応が進行すると考察した。

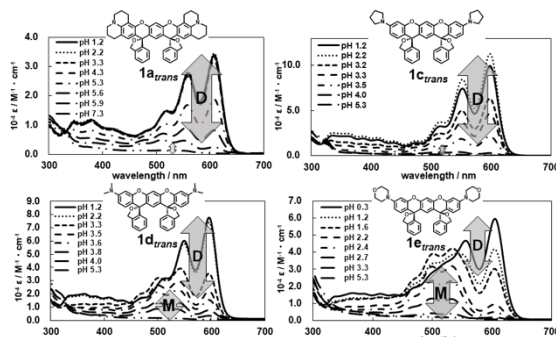


Fig. 1 Absorption spectra of **1a_{trans}**, **1c_{trans}**, **1d_{trans}**, **1e_{trans}** in 10% DMSO/buffer.

[2] 光と化学的刺激に対し蛍光色が2段階に変化するアクチベータブル分子の開発²

光、溶媒極性、pH、電気、力といった外部刺激に応答して光物性が変化する応答性分子は分子スイッチとして生命科学や機能性物質科学などの分野で注目されており、新たな作動原理や機能の創出が求められている。外部刺激によって、二つの異なる状態をスイッチできる応答性分子は多数報告されている一方、外部刺激に対して三つの状態を変換可能な分子は、応答部位の構造変換を制御することが困難なためほとんど報告がない。研究代表者らは、Fig. 2 に示す応答部位である二つのスピロラクトン (SL) 環が開環した ABPX-SL (**4_{cis}**) の刺激応答性を調べる中で、光の照射により SL 環の一つが選択的に開環することを見出した。

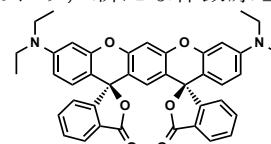


Fig. 2 Chemical structure of *cis*-ABPX-SL (**4_{cis}**).

4_{cis} の CHCl₃ 溶液に紫外光を 20 分間照射し吸収スペクトルを測定した結果、305 nm に吸収極大を有する **4_{cis}** の吸収帯が減弱し、338 nm に等吸収点を伴い、500 nm 付近に振電構造を有する吸収帯が出現した。蛍光スペクトルは、500 nm 付近の蛍光極大が減弱し、550 nm 付近に極大をもつ発光帯が観測された (Fig. 3)。光照射後の溶液は橙色を呈したことから、光照射生成物はスピロ環が開環した構造と推定した。そこで本生成物の化学構造を明らかにする目的で、**4_{cis}** の CHCl₃ 溶液にトリメチルシリルシアニドを加え、室温下 2 時間光照射することで捕捉実験を試みた。その結果、発色団のキサンテン環部位に一つのシアノ基が付加した構造体が得られ、本構造は単結晶 X 線結晶構造解析により確認した。一方、同様の反応を遮光条件下で行った場合、付加体はほとんど生成しなかった。本結果より光照射生成物の一つのスピロ環が開環した有色の双性イオン体であることがわかった。また、**4_{cis}** の 1,2-DCE 溶液にアゾビスイソブチロニトリル (AIBN) を加え、室温下で 2 時間紫外光を照射した結果、2-シアノ-2-プロピルラジカルが付加体得られたことから、本光反応はラジカルを経る、双性イオン体が生成する反応経路の存在も示唆された。

最後に、光を照射することで得られた双性イオン体の CHCl₃ 溶液に、トリフルオロ酢酸 (TFA) を加えるとジカチオン体に変化することを見出した。CHCl₃ 溶液中で、ABPX は緑色蛍光、双性イオン体は黄色蛍光、ジカチオン体は赤色蛍光を示す。これらの結果より、光と酸の刺激を組み合わせることで蛍光性の分子ロジックゲートを構築することを着想した (Fig. 4)。本分子システムにおいて、物理的 (305 nm UV) および化学的 (1% TFA) 入力によって、RGB 蛍光出力 (515 nm, 580 nm, 630 nm) を達成した。

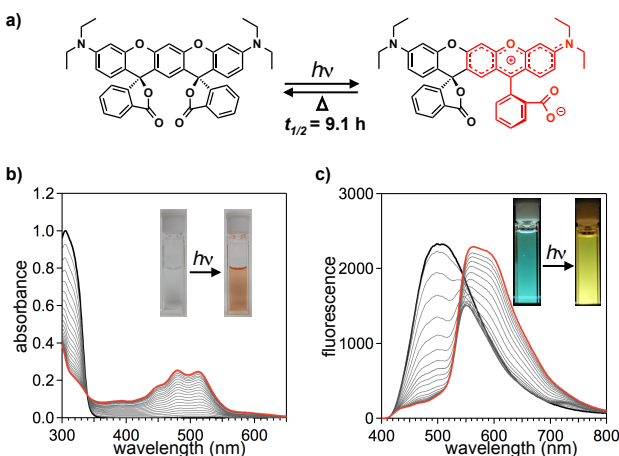


Fig. 3 (a) Absorption and (b) fluorescence spectra of **4_{cis}** (40 μM) in CHCl₃ before and after UV irradiation.

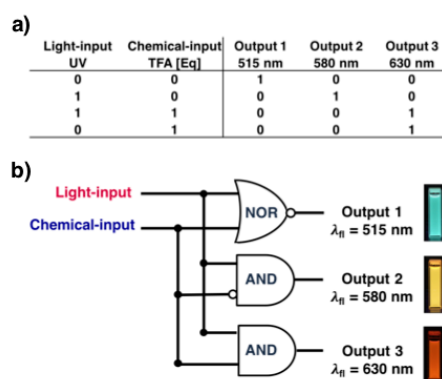
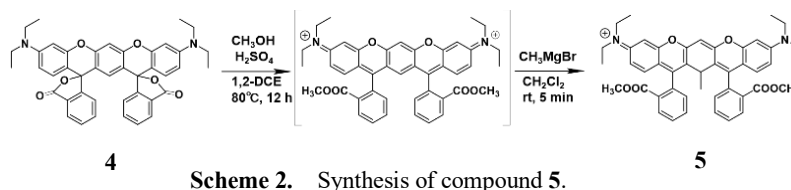


Fig. 4 (a) Truth table and (b) logic gate diagram.

[3] 可視域から近赤外域に蛍光波長が切り替わる新規縮環型シアニン系色素の合成

近赤外光は、700–2000 nm の光でありその高い物質透過性より、生体深部のイメージングや高線力学的治療などへの応用が期待されている。しかしながらその数や種類は限定されており、近赤外光を利活用できる分子の創出が望まれている。研究代表者らは、ABPX の誘導化に取り組む中で、近赤外域に強い蛍光を示す化合物が得られる反応を新たに見出した。そこで本研究では、本近赤外発光体の合成、構造、光物性を解明することを目的に研究を行った。



既知化合物の **4** を硫酸存在下メタノールを用いてメチルエステルへ変換した後、過剰の CH_3MgBr を添加することで緑色の呈色体を得た (Scheme 2)。本呈色体の化学構造を解析した結果、**4** の 9 位にメチル基が導入された構造 (**5**) であることがわかった。続いて、**2** をクロロホルムに溶解させ、吸収と蛍光スペクトルを測定した結果、極大吸収波長は 680 nm を示し、722 nm をピークトップとする近赤外域に蛍光発光を示した (Fig. 5)。また 1.0%トリフルオロ酢酸 (TFA) 含有クロロホルム中で測定した 4^{++} と比べ、**5** の吸収帯は 83 nm、発光帯は 101 nm 長波長側にシフトした。さらに、化合物 4^{++} 、**5** について DFT 計算を行ったところ、**5** の吸収帯は化合物 4^{++} と比較し、長波長シフトすることが示唆され、実験結果とよく一致した。また本吸収帯は HOMO-LUMO に帰属され、分子軌道計算より $\pi-\pi^*$ 遷移に由来することがわかった。本結果より、**5** はメチル基の導入により、発色団の π 電子系が拡張しキノイド型構造を形成した結果、吸収帯・発光帯が大きくレッドシフトし、近赤外領域に発光を示すと考察した。

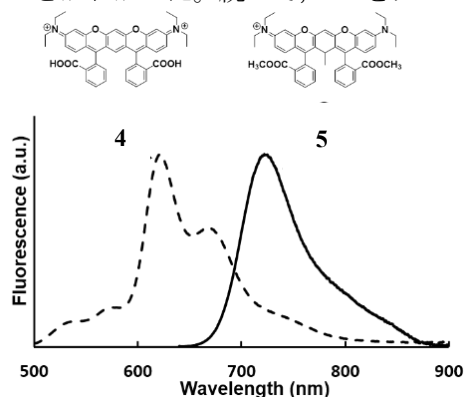


Fig. 5 Fluorescence spectra of compounds **5** in CHCl_3 (solid line) and 4^{++} in 1% TFA/ CHCl_3 (dashed line).

<引用文献>

1. Ryosuke Hosoda, Shinichiro Kamino, Daisuke Sawada, Syntheses and Acid-stimulus Responsiveness of Aminobenzopyranoxanthene Spiroethers, *Heterocycles*, **99**, 820-824 (2019).
2. Masaru Tanioka, Shinichiro Kamino, Natsumi Koga and Dausuke Sawada, Stepwise Structural and Fluorescent Colour Conversion in Rhodamine Analogues Based on Light and Acid Stimulations, *J. Mater. Chem. C*, **8**, 543-549 (2020).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Tanioka Masaru, Kamino Shinichiro, Koga Natsumi, Sawada Daisuke	4. 巻 8
2. 論文標題 Stepwise structural and fluorescent colour conversion in rhodamine analogues based on light and acid stimulations	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Materials Chemistry C	6. 最初と最後の頁 543 ~ 549
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C9TC05054J	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 Kamino Shinichiro	4. 巻 139
2. 論文標題 Development of External Stimuli-responsive Organic Molecules and the Creation of Novel Photo-functions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 975 ~ 986
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.19-00005	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 Shinichiro Kamino, Masaru Tanioka, Daisuke Sawada	4. 巻 76
2. 論文標題 Development of chromic molecule that can change color and absorption/fluorescence wavelengths largely in response to external stimuli	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Syn. Org. Chem. JPN (Yuki Gosei Kagaku Kyokaiishi)	6. 最初と最後の頁 1066-1075
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5059/yukigoseikyokaiishi.76.1066	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 Kamino Shinichiro, Sawada Daisuke, Hosoda Ryosuke, Ueda Masashi	4. 巻 99
2. 論文標題 Syntheses and Acid-Stimulus Responsiveness of Aminobenzopyranoxanthene Spiroethers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 HETEROCYCLES	6. 最初と最後の頁 820-824
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3987/COM-18-S(F)66	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 Natsumi Fukino, Shinichiro Kamino, Minami Takahashi, Daisuke Sawada	4. 巻 82
2. 論文標題 Synthesis of Aminobenzopyranoxanthenes with Nitrogen-Containing Fused Rings	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 13626-13631
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.7b02290	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 0件)

1. 発表者名 神野伸一郎, 吹野なつみ, 高橋みなみ, 澤田大介
2. 発表標題 電子系拡張型キサンテン系ロイコ色素の合成と光物性の評価
3. 学会等名 第15回次世代シンポジウム (東京)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 神野伸一郎, 谷岡卓, 村中厚哉, 白崎良尚, 大山陽介, 内山真伸, 榎本秀一, 澤田大介
2. 発表標題 クロミズム特性を有するアミノベンゾピラノキサンテン系機能性色素の開発
3. 学会等名 第111回有機合成シンポジウム (岡山)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 M. Tanioka, S. Kamino and D. Sawada
2. 発表標題 Photochromic properties of aminobenzopyranoxanthene
3. 学会等名 2017年光化学討論会 (仙台)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 谷岡卓, 神野伸一郎, 澤田大介
2. 発表標題 アミノベンゾピラノキサnten系 (ABPX) 色素の光異性化の解明
3. 学会等名 第56回日本薬学会中国四国支部学術大会 (徳島)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 赤松祐季, 神野伸一郎, 澤田大介
2. 発表標題 炭素 - 水素結合の直接窒素化反応を基盤とした連続環化による含窒素多環式化合物の合成研究
3. 学会等名 第56回日本薬学会中国四国支部学術大会 (徳島)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 細田遼介, 神野伸一郎, 澤田大介, 上田真史
2. 発表標題 スピロ環構造を改変したローダミン系色素の合成とpH応答性の評価
3. 学会等名 日本薬学会第137年会 (金沢)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 谷岡卓, 神野伸一郎, 澤田大介
2. 発表標題 光スイッチング機能をもつ新規ローダミン系色素の合成と光化学特性
3. 学会等名 日本薬学会第137年会 (金沢)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神野伸一郎, 谷岡卓, 澤田大介
2. 発表標題 光と化学的刺激に対しスイッチ機能を有する応答性分子の開発
3. 学会等名 第44回反応と合成の進歩シンポジウム(熊本)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神野伸一郎
2. 発表標題 外部刺激で光機能と構造を段階的に操作する分子技術の開発
3. 学会等名 有機合成若手講演会 先魁プロジェクト 2018 セミナー 有機元素化学が切り拓く創薬研究(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷岡卓, 原田芽生, 村中厚哉, 岡本悠汰, 宮本和範, 神野伸一郎, 内山真伸
2. 発表標題 キノジメタン系安定ラジカルカチオンの 合成と性質
3. 学会等名 第45回反応と合成の進歩シンポジウム(倉敷)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神野伸一郎, 古賀奈津美, 澤田大介
2. 発表標題 pHに応答して構造と色が2段階に変化するアクチベータブルプローブの開発
3. 学会等名 有機合成化学セミナー(岐阜)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 新規近赤外発光化合物及びその製造方法	発明者 神野伸一郎、澤田大介、榎本秀一、渡辺恭良	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、162404	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究協力者	澤田 大介 (Sawada Daisuke) (00338691)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授 (15301)	
研究協力者	谷岡 卓 (Tanioka Masaru) (40846359)	愛知学院大学・薬学部・助教 (33902)	