

令和 5 年 4 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20539

研究課題名(和文)近赤外領域に高い二光子吸収能を持つケージド化合物の設計、合成、生理学実験への応用

研究課題名(英文) Design and Synthesis of Caged Compound with High Two-Photon Absorption Character in Near IR Region : Its Application to Physiological Experiments

研究代表者

千歳 洋平 (Chitose, Youhei)

九州大学・工学研究院・助教

研究者番号：60911534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で開発したD- -D型クマリン誘導体は、2光子励起蛍光法によって、700 nm付近におよそ498 GMと比較的高い2光子吸収断面積を有することが実験的に示された。この値から、クマリン誘導体を保護基として安息香酸を保護したケージド安息香酸の2光子アンケーシング効率は134GMと見積もることができた。さらに、レーザーフラッシュホトリシス法とNMRを用いた生成物分析によって、ケージド安息香酸の光反応後に生じるメチルカチオン中間体を捕捉できたため、アンケーシングの際にC-O結合がヘテロリシスによって結合解離を起こしていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既存の7-ジエチルアミノクマリン骨格の3位に2重結合を持つ電子供与基部位を導入することで、比較的高い2光子吸収断面積を付与することができた。今後、D- -D型クマリン誘導体を基盤骨格とする光解離性保護基を用いたケージド化合物を開発することで、低毒性かつ生体透過性の高い近赤外領域の2光子励起を用いて生物活性物質の濃度上昇を時空間的に制御することができる。こうした技術を応用することによって、生体深部における疾患部位の回復や、脳内における神経伝達物質の機能解明に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a Donor- -Donor (D- -D) based coumarin derivative. Its two-photon absorption (TPA) cross-section was determined to be 498 GM at 700 nm by two-photon excited fluorescence method. The two-photon uncaging efficiency of D- -D based caged benzoic acid was also determined to be 134 GM at 700 nm, which indicates relatively high two-photon responsive chromophore. In addition, we investigated the detail mechanism of bond cleavage steps in the uncaging reaction of caged benzoic acid. The laser flash photolysis experiments and product analysis suggested the presence of methyl cation intermediate which indicated the heterolysis of C-O bond.

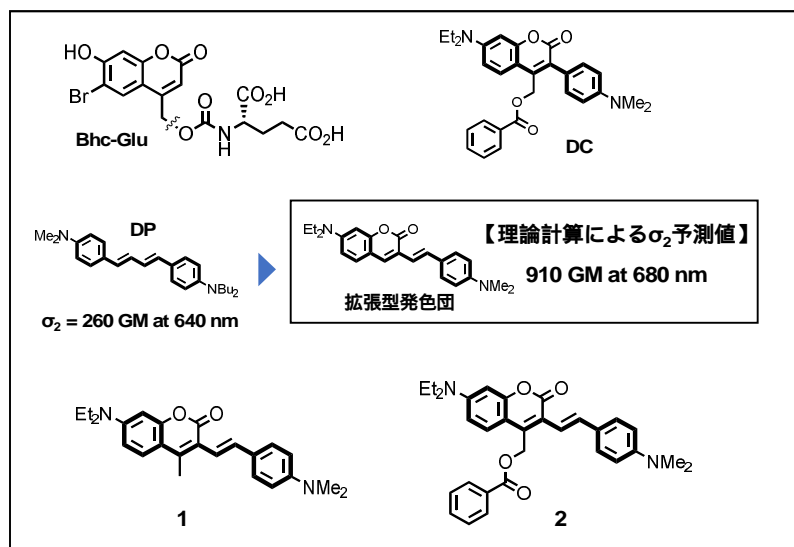
研究分野：有機光化学

キーワード：2光子吸収 ケージド化合物 光解離性保護基 反応中間体

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生物活性物質(神経伝達物質や抗がん剤)の活性部位を光解離性保護基により保護し、一時的に不活性化した「ケージド化合物」は、光を作用させることで脱保護(アンケーシング)反応が進行し、活性を再現することができる。ケージド化合物を用いて、生体内における生物活性物質の濃度上昇を時空間的に制御できれば、活性物質の機能発現機構の理解に繋がり、新たな疾患治療法や新薬の開発に貢献できる。ケージド化合物のアンケーシング反応には主に紫外光(<400 nm)が多く用いられてきたが、紫外光は生体透過性が低く、また細胞毒性が高いという問題点がある。近年では、低毒性かつ高い生体透過性を持つ近赤外領域(680-1050 nm)の二光子励起法を駆使したアンケーシング技術が開発され、より細胞深部でのアンケーシング反応が可能となった。ケージド化合物の2光子アンケーシング効率 $\delta_0$ は、アンケーシング量子収率( $\Phi_0$ )と2光子吸収断面積( $\sigma_2$ )の積( $\Phi_0 \times \sigma_2$ )で表される。先行研究で開発されたクマリン型ケージドグルタミン酸(Bhc-Glu, *PNAS*, **1999**, 96, 1193-1200.)の2光子アンケーシング効率( $\delta_0$ )は740nmにおいて1GMであった。生体内で効率よくアンケーシング反応を行うためには、2光子反応効率 $\delta_0$ が3GM以上であることが望ましく(*EBJ*, **2002**, 30, 588-604.)、より高い2光子反応効率を得るためには保護基部位の2光子吸収断面積を向上させる必要があった。申請者の先行研究では、分子の両端に電子供与基(Donor)を持つD- $\pi$ -D型クマリン誘導体DCが近赤外領域に2光子吸収能を有することを見出していた(*Org. Lett.* **2017**, 19, 2622-2625.)。そこで、申請者はD- $\pi$ -D型diphenylpolyene(DP)誘導体が高い2光子吸収断面積(260 GM)を示すことに着目し(*JACS*, **2000**, 122, 9500-9510.)、さらに2重結合で $\pi$ 共役系を拡張したD- $\pi$ -D型クマリン発色団を設計したところ、理論計算から680 nmにおいて高い2光子吸収断面積(910 GM)を示すことが予測された。 $\pi$ 共役系を拡張したD- $\pi$ -D型クマリン発色団を光解離性保護基の基本骨格として用いることで、より高い2光子アンケーシング効率を得られると期待される。



### 2. 研究の目的

近赤外領域に高い2光子吸収能を持つクマリン型保護基を開発し、2光子励起によるアンケーシング反応効率を算出し、細胞内において任意の時間と場所で活性物質の濃度上昇の制御を行う。未知の活性物質の機能発現メカニズムを解明することで、新たな疾患治療法や新薬の開発に貢献する。

### 3. 研究の方法

まず、D- $\pi$ -D型クマリン発色団1の合成を行い、2光子吸収断面積の測定を行う。その後、1を保護基として活性物質のモデル化合物となる安息香酸を保護したケージド安息香酸2を合成し、1光子励起と2光子励起によるアンケーシング反応を実施する。1と2の2光子測定では高強度フェムト秒超短パルスレーザーを用いて行う。1の2光子吸収断面積測定では2光子励起蛍光法を用いて行い、2の1光子(紫外可視光)または2光子(近赤外光)アンケーシング反応では、溶液中で光を照射し、2の減少と安息香酸の生成をNMRやHPLCなどの分析装置を用いて確認する。

また、細胞内アンケーシングへの応用に向けて、ケージド安息香酸2の光反応中間体の調査を行う。具体的には、2の光反応中間体としてカルボカチオン中間体の発生が示唆されるため、反応系中の水でトラップし、アルコール体として単離し、カチオン中間体の存在を確認する。カルボカチオン中間体の生成とその反応ダイナミクスを調査するため、レーザーフラッシュフォト

リス法を用いた 2 の過渡吸収スペクトル測定を行い, 2 のアンケーシング反応機構を精査する.

さらに, 本研究とは異なるプロジェクトで共同研究している筑波大学 WPI 機構の M.Lazarus 研究グループとの共同研究のもと, 水溶性を付与したクマリン型保護基に抗がん剤や睡眠誘導剤などの活性物質を導入し, 光ドラッグデリバリーによる疾患治療や睡眠機構解明に寄与する研究を進める.

#### 4. 研究成果

2 重結合で  $\pi$  共役系を拡張した D- $\pi$ -D 型クマリン発色団 1 とケージド安息香酸 2 は, 市販の 7-diethylamino-4-methylcoumarin からそれぞれ合成を達成した. 1 について, トルエン中における発光量子収率は 0.77 と求められていたため, フェムト秒超短パルスレーザーを用いて近赤外 2 光子励起による 1 からのアップコンバージョン発光の観測を試みた. 700 nm のパルス光を 1 のトルエン溶液に照射したところ, 緑色発光が観測されたため, 1 の 2 光子吸収断面積を 2 光子励起蛍光法によって算出することとした. 分光器を用いて 1 からの 2 光子励起アップコンバージョン発光を取り込み, フルオレセインを参照化合物として用いて, 700 nm における 1 の 2 光子吸収断面積を相対的に算出したところ, 498 GM と比較的高い 2 光子吸収断面積の値を示した. ここで, ケージド安息香酸 2 の 1 光子アンケーシング量子収率は DMSO 中で 0.27 と求められていたので, 2 の 2 光子アンケーシング効率  $\delta_{\text{u}}$  は  $498 \times 0.27 = 134 \text{ GM}$  と算出された. この  $\delta_{\text{u}}$  の値は生理学実験に応用可能な範囲であり, 本研究で設計した  $\pi$  拡張型 D- $\pi$ -D クマリン骨格を持つケージド化合物は, 今後 細胞深部におけるアンケーシング反応が可能となることが示された.

また, ケージド安息香酸 2 を用いて, レーザーフラッシュフォトリス法による過渡吸収測定 (355 nm 励起, 窒素雰囲気下, アセトニトリル中, 298 K) を実施したところ, 420-560 nm (第 1 吸収帯) と 580-800 nm (第 2 吸収帯) の 2 つの過渡吸収帯が観測された. 量子化学計算を用いて過渡種の帰属を試みたところ, 第 1 吸収帯はケージド安息香酸 2 の C-O 結合がヘテロリス解離して生成するカルボカチオン中間体であることが示唆された. 2 の光反応を体積分率で 10% の水が添加された重 DMSO 中で行った際に, クマリンの 4 位がヒドロキシル基で修飾されたアルコール体が単離された. この実験事実からカチオン中間体の存在が支持された. さらに, 第 1 吸収帯は酸素雰囲気下でも存在することから, 一重項状態の過渡種であり, この結果もカチオン中間体の存在を裏付けている. 一方で, 第 2 吸収帯に関しては帰属しきれず, ケージド安息香酸 2 の励起三重項吸収と, 未同定の長寿命 (数ミリ秒オーダー) 過渡種が重なって観測されている. 今後, 未同定の長寿命過渡種の帰属が課題となる.

本研究を通して, D- $\pi$ -D クマリン誘導体の光反応機構の調査と 2 光子吸収能の評価を行うことができた. 特に, ケージド安息香酸 2 の光反応時に生成する中間体を実験的に捕捉し, 反応機構を詳細に調査できたことは, 今後, 類似のクマリン型ケージド化合物を生体応用する際に, 細胞内におけるアンケーシング反応や副反応のメカニズムについて考える上での重要な情報となる. さらに, 2 光子励起蛍光法による発色団の 2 光子吸収断面積の測定手法を構築し, D- $\pi$ -D クマリン型ケージド化合物が高い 2 光子アンケーシング効率 ( $\delta_{\text{u}} = 134 \text{ GM}$ ) を有していることを見出した. これにより, 今後の 2 光子励起可能な光解離性保護基また発色団の開発の加速に繋がると期待される.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tatsuya Morofuji, Shota Nagai, Youhei Chitose, Manabu Abe, and Naokazu Kano	4. 巻 23
2. 論文標題 Protonation-Enhanced Reactivity of Triplet State in Dearomative Photocycloaddition of Quinolines to Olefins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 6257 ~ 6261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.1c02026	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 Thuy Thi Thu Pham, Youhei Chitose, Tran Thi Thanh Tam, Wei-Lun Tseng, Tzu-Chau Lin, and Manabu Abe	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 Yuki Hyodo, Keigo Takahashi, Youhei Chitose, Manabu Abe, Michito Yoshizawa, Takashi Koike, Munetaka Akita	4. 巻 33
2. 論文標題 Assemblies of 1,4-Bis(diarylamino)naphthalenes and Aromatic Amphiphiles: Highly Reducing Photoredox Catalysis in Water	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Synlett	6. 最初と最後の頁 1184-1188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/a-1652-2707	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Youhei Chitose, Manabu Abe, Tzu-Chau Lin, Claudine Katan
2. 発表標題 Design, Synthesis, and Photoreactions of Near Infrared Two-photon Responsive Caged Compounds Bearing Coumarin Scaffold
3. 学会等名 Joint Symposium between CSIR-CDRI and HiU-P-DDS (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 千歳 洋平, 安倍 学, 林 子超, クラウディン カタン
2. 発表標題 近赤外二光子吸収能を有するケージド化合物の設計, 合成, 光反応
3. 学会等名 第10回JACI/GSCシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 千歳 洋平, 安倍 学, 林 子超, クラウディン カタン
2. 発表標題 D- -D 構造を有する近赤外二光子応答性クマリン型ケージド化合物の設計, 合成, 光反応
3. 学会等名 第37回有機合成化学セミナー
4. 発表年 2021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

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