

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460039

研究課題名(和文) 電位応答型蛍光プローブの機能発現構造の物理化学的探索と設計に関する基礎研究

研究課題名(英文) Physicochemical study on molecular design of a fluorescent probe responding to internal potentials

研究代表者

宇野 文二 (Uno, Bunji)

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：80160307

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)： 癌細胞の低酸素応答に対する薬物治療や癌の低電位細胞を創薬ターゲットとする新しい研究に有用な電位応答型蛍光プローブの設計のための基礎研究を行った。蛍光プローブを構成する蛍光部位と電位応答部位の架橋は、直接の共役を避けかつなるべく短く設計することが効率的な光誘起電子移動に重要であることを示した。また、電位応答部位にフェロセンのみならずヒドロキノンやカテコール化合物、蛍光部位に従来の蛍光性物質に加えオルトカルボラン類の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)： Molecular design of a fluorescent probe responding to internal potentials, useful for innovative drug development against cancer, is discussed from the point of view of function of the crosslinked structure between fluorescent and response groups in the probe. It has been found that efficient photo-induced electron transfer occurs in the crosslinking of a short methylene chain and is inhibited by intermolecular electron transfer in the conjugated crosslinking. In addition, hydroquinone and catechol as well as ferrocene were found to be the good candidates for response groups to internal potential. On the other hand, o-carborane is likely to be the new fluorescent groups in the probes.

研究分野：物理系薬学 有機電子移動化学

キーワード： 蛍光プローブ 電位応答 光誘起電子移動 分子内電子移動 フェロセン ダンシル基 プロトン移動
共役電子移動 オルトカルボラン

1. 研究開始当初の背景

癌細胞の低酸素応答が、浸潤・転移、血管新生など、癌の悪性と密接に関係していることはよく知られている。電気分析化学分野では、マイクロダイアリシスの技術を駆使して、酸素電極を用いて実際に癌細胞の電位を測定し、癌の増殖過程のうちの一時期、癌細胞が低電位で極めて低酸素状態の細胞として存在することを明らかとしている。また、低酸素環境の癌細胞は休眠状態と考えられ、放射線療法や化学療法の治療効果が低いことも知られている。癌細胞の休眠する仕組みや休眠している癌細胞の特徴を明らかにすることは、低酸素状態の癌治療法の開発や休眠状態の癌細胞を標的とした創薬研究のために欠くことはできない。

このような背景から、生理的イベントにตอบสนองして空間的および時間的に優れた分解能で細胞の電位にリアルタイムにตอบสนองして可視化する電位応答型蛍光プローブが必要となっている。これまでの蛍光プローブは、プローブ中の基質認識部位と検出対象の基質との特異的化学反应によって蛍光特性を制御してきた。したがって、電位応答部位をもつ新しい概念の蛍光プローブの開発が必要となり、電位応答によって蛍光部位の光誘起電子移動 (PeT) や蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を制御するための基礎研究が急務といえる。

2. 研究の目的

本研究では、電位応答型蛍光プローブ開発の物理化学的基礎研究とそれに基づくプローブの分子設計および試作および試作プローブの機能評価に関する基礎研究を行うことを目的とした。

(1) フェロセンを電位応答部位とする蛍光プローブの設計と試作：電気化学的応答が可逆で電子移動速度が大きいフェロセンを電位応答部位、クマリンまたはダンシル基を蛍光部位とした化合物を合成し、フェロセン部位の酸化還元応答に対する PeT のスイッチ機能によるクマリンまたはダンシル基の蛍光特性を制御する基礎研究を行った。特に、応答部位と蛍光部位を連結する架橋構造の分光学的役割は知られていない。そこで、架橋の構造特性と PeT の関係を明らかにして、本蛍光プローブの設計を行った。そして、試作プローブの動作確認により、その設計法を構築した。

(2) オルトカルボランを利用した蛍光プローブの基礎研究：オルトカルボランは、正二十面体の構造をもつ安定なホウ素のクロソ構造のクラスターである。それぞれの結合は 3 中心 2 電子結合し、分子全体としてはパイ電子が三次元的に非局在化する超芳香族性を利用した機能性分子の研究が注目されている。しかし、カルボラン骨格と共役 π 電

子間相互作用の詳しい機序やその特性を生かした蛍光特性は知られていない。本研究では、カルボランの超 π 電子系と共役 π 電子系電子間の相互作用とその蛍光特性を明らかにし、カルボラン骨格の蛍光プローブの蛍光部位としての可能性を検討した。

(3) スーパーオキシド生成にตอบสนองするフェノール性化合物の構造特性と特異的電子移動：ポリフェノールをはじめとするある種のフェノール類は、いわゆる抗酸化物質として知られ、フェノール類とラジカル間で起こる広義の proton-coupled electron transfer (PCET) 反応が着目されている。一方、生体内のフリーラジカル反応のファーストステップは、細胞内電位にตอบสนองして生成する内因性のスーパーオキシドと考えられ、スーパーオキシドは生細胞中の重要な生物学的中間体と考えられている。スーパーオキシド生成にตอบสนองするフェノールの電位認識は、電位応答型蛍光プローブの電位応答部位として期待される。本研究では、スーパーオキシドと効率的な PCET 反応を示すフェノール類の構造特性とその電子移動反応メカニズムを明らかにし、蛍光プローブの電位応答部位として可能性を検討した。

3. 研究の方法

(1) フェロセンを電位応答部位とする蛍光プローブの設計と試作

モデル化合物の合成：モデル化合物として、蛍光部にクマリン化合物、電位応答部に電位に対する可逆的応答性に優れたフェロセンを選択して、クマリンの 6 位または 7 位をフェロセンカルボン酸とエステル結合で架橋して得た置換フェロセン MOB6F, MOB7F, MC7FC を合成した。また、蛍光部位をダンシル基、酸化還元応答部位をフェロセンとして、フェロセンカルボン酸またはアミノフェロセンとダンシルクロリドを原料として、フェロセンとダンシル基が $-SO_2NH-(CH_2)_n-NHCO-$ で架橋された化合物 DFC ($n=0, 2, 3, 4, 5$) を合成した。

モデル化合物の電気化学特性と蛍光特性：アセトニトリル中のサイクリックボルタモグラム測定、酸化および還元状態の紫外可視吸収スペクトル、蛍光スペクトル測定を行った。また、これらの測定結果の解析には b3lyp 関数を用いる密度汎関数理論 (DFT) 計算を行い、その構造と酸化還元に応答する蛍光特性を明らかにした。以上より、電位応答型蛍光プローブの設計に言及した。

(2) オルトカルボランを利用した蛍光プローブの基礎研究：オルトカルボランおよびその炭素上の水素原子を 2 つの共役環で置換した化合物 1,2-ジフェニルカルボラン (DPC), 1-ナフチル-2-フェニルカルボラン (NaphPC), 1-フルオロフェニル-2-フェニルカルボラン (FPhPC), 1-メトキシフェニル-2-フェニルカ

ルボラン (MOPhPC), 1-ニトロフェニル-2-フェニルカルボラン(NOPhPC)を合成した。これら化合物について, 3 電極系のサイクリックボルタメトリーを用いた電気化学的測定, 分光測定および DFT 計算 (B3LYP/PCM/6-31+G(d)) を行い, カルボランの超電子系の特性を生かした蛍光物質の設計法を探索した。

(3) スーパーオキサイド生成にตอบสนองするフェノール性化合物の構造特性と特異的電子移動: フェノール類として, カテコール (OQH₂), ヒドロキノン (PQH₂), 置換フェノールおよび天然ポリフェノール類を用いた。また, OQH₂ および PQH₂ の各種メチル, クロル置換体も用いた。電気化学測定は, それぞれのフェノール存在下における, 酸素の一電子還元によるスーパーオキソ生成に対する可逆波の影響をサイクリックボルタモグラムとして測定した。その測定には, グラッシーカーボン作用電極, 白金対極, 非水用参照電極を用いた 3 電極系とした。ESR 測定は in situ 型電解セルを用い, スーパーオキソとヒドロペルオキシラジカルの検出はスピントラップ剤として 5,5-ジメチル-1-ピリジン-N-オキソイド (DMPO) を用いた。また, 理論的解析は B3LYP/6-31+G(d) による DFT 計算を利用した。

4. 研究成果

(1) フェロセンを電位応答部位とする蛍光プローブの設計と試作

クマリンを蛍光部位とするプローブ: 合成した化合物の電気化学特性を明らかにし, 酸化応答に対する蛍光特性の変化を観測した。合成した MOB6F, MOB7F, MC7FC は, 何れも低電位では PeT が機能して無蛍光, 高電位を印加した場合には PeT が解除されて蛍光を発すること確認した。しかし, この蛍光は瞬間的にしか観測されなかった。この原因は, フェロセン部位の酸化によって引き起こされる蛍光部位からの分子内電荷移動であると考えられた。実際, これら化合物のサイクリックボルタモグラムは, 高速掃引では可逆的であった電極応答が低速掃引とともに不可逆的となり, 分子内電荷移動によってクマリン部位に酸化分解が起こることが分かった。したがって, クマリン-フェロセン架橋化合物は, 酸化に伴う分子内電子移動が惹起される新しい系として興味を持たれるが, 蛍光プローブへの応用は期待できなかった。

ダンシル基を蛍光部位とするプローブ: ダンシルクロリドとフェロセンを架橋した化合物 DFc(0) ~ DFc(5) は, 何れもフェロセンの酸化に基づく可逆なボルタモグラムを与え, その電位は DFc(0) を除きフェロセンとほぼ同じ値であった。DFc(0) はこれらより負側に観測された。これは DFc(2) ~ DFc(5) には, フェロセンとダンシル基のπ電子間には直接的な相互作用がないこ

とを示している。一方, 吸収スペクトルは 360 nm および 450 nm に, それぞれダンシル基, フェロセンに由来する吸収があった。340 nm を励起光として蛍光スペクトルを測定すると, 何れの化合物もダンシル基本来の蛍光より著しく減弱され, 蛍光強度の強さは DFc(5) > DFc(4) > DFc(3) > DFc(2) > DFc(0) の順となった (図 1)。DFc(0) の蛍光は, 共役を通じた分子内電荷移動によって消光したものと考えられる。一方, 直接的な共役を断ち切っている DFc(2) ~ DFc(5) の蛍光は, 結合を介したダンシル基とフェロセン環の光誘起電子移動 PeT によって消光したものと考えられる。

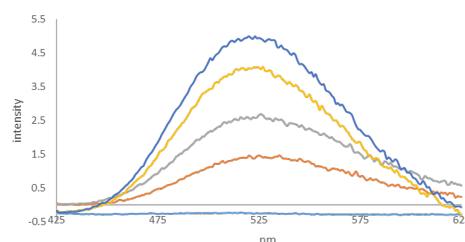


図 1 DFc($n = 0, 2, 3, 4, 5$)の蛍光スペクトル
下から順に, n が小さい順。

分子内の PeT は, 蛍光プローブの蛍光のオン-オフの切り替えに利用される重要な機構である。しかし, 蛍光プローブ内の電子供与体と受容体を結ぶ架橋鎖の構造は, PeT に重要な影響を与えていると考えられているが, その詳細は不明であった。架橋を介した電子供与体と受容体の相互作用は, エキシマー生成に関わる架橋の長さを説明した平山ルール (架橋の長さ $n = 3$) として知られているが, PeT との係わりは明確でない。本研究の成果として, 架橋は PeT の電子移動の道筋を示し, その長さは電子移動を阻害させることが分かった。また, PeT 機構の発現にはエキシマー生成のような空間的に相互作用する配置は求められないため, 架橋の長さに空間的配置を制御する必要がないことが分かった。このことは, PeT が結合を介して機能することを初めて示したものである。

次に酸化状態の蛍光スペクトルを測定したところ, 何れの化合物の蛍光強度も増強した。これは, フェロセン部位の酸化によって電子受容性が増大して PeT が解除され, 蛍光強度が増強したものと考えられる。したがって, フェロセン-ダンシル基結合型化合物の場合, 直接的な分子内電荷移動を避け, $n = 2$ 程度の結合鎖を用いたとき, 機能的に電位応答型蛍光プローブが設計できるものと考えられた。

(2) オルトカルボランを利用した蛍光プローブの基礎研究

ホウ素は電子欠損原子として知られ, 一般に含ホウ素化合物は電子受容性を示すため, カルボランも低い還元電位を有することが

期待される。しかし、オルトカルボランはジクロロメタンや DMF の電位窓内でも全く還元されなかった。一方、DPC、NaphPC、FPhPC、MOPhPC、NOPhPC は、図 2 に示すように、何れの化合物も見かけ上可逆的な 2 電子還元波を示した。しかし、測定された電位は化合物の最低非被占軌道 (LUMO) とは直接的関係 (Koopmans の定理) になく、置換基の電子的効果とは独立にすべての化合物でほぼ一定の値であった。還元電位で定電位電解して測定した ESR スペクトルは、すべての試料で線幅がおよそ 6 mT の広いスペクトルが観測されたことから、アニオンラジカルはカルボラン骨格に分布していると考えられた。一方、化合物の LUMO は置換した π 共役環に分布していたが、これらのアニオンラジカルの一電子占有軌道 (SOMO) はカルボラン部位に分布しており、ESR スペクトル測定結果とよく一致した。

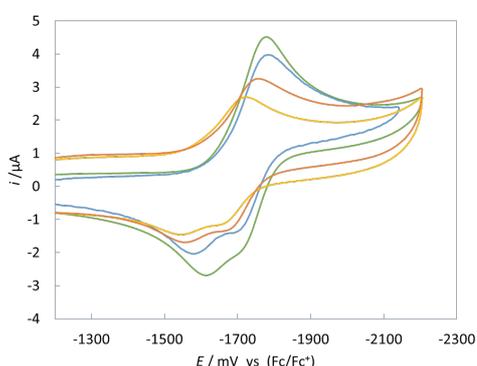


図 2 . DPC (青線), NaphPC (黄線), FPhPC (赤線) および MOPhPC (緑線) のサイクリックボルタモグラム

以上の結果は、ラジカル生成によって大きな構造変化を期待させた。実際に、DFT 計算による最適化構造から、還元に伴う特徴的な構造変化が示唆された。つまり、アニオンラジカル生成によって、電子受容に関わるカルボラン環の拡張のみならず、パイ共役環の付け根の C-C の結合長が特徴的に伸長し大きな口を開いた構造をとる。この構造変化には 2 枚の共役環が重要な役割を果たしており、共役環を持たないオルトカルボラン自身では、この構造変化は起こらなかった。また、構造変化に伴ってカルボラン環に 1 電子挿入されると、カルボラン環の SOMO の電子間反発の低さから容易に 2 電子目が挿入されるため、連続的な 2 電子移動が観測されるものと考えられた。実際に、掃引速度を変化させてサイクリックボルタモグラムを観測すると、DPC の還元第 1 波は掃引速度に依存してそのピークセパレーションが大きく変化したが、還元第 2 波のセパレーションは一定で掃引速度に依存せず可逆波であった。したがって、第 1 波は構造変化を伴った遅い電子移動、第 2 波は極めて速い電子移動であることが示唆された。

以上の結果、オルトカルボランに 2 枚の共役環が置換したときのみ、カルボラン環に電子を挿入することができ、より電子供与性の共役環を置換することにより、カルボランからの分子内電荷移動蛍光が期待された。したがって、オルトカルボランの特徴を生かした新しい蛍光物質の創生が期待された。

(3) スーパーオキサイド生成にตอบสนองするフェノール性化合物の構造特性と特異的電子移動

スーパーオキサイドとフェノール類との反応は、酸塩基反応として知られてきた。しかし、OQH₂、PQH₂ およびこれらの骨格を含む天然ポリフェノール類に限り、スーパーオキサイドとの間にプロトン移動と共役する電子移動を観測することができた。図 3 に、酸素/スーパーオキサイドの酸化還元対の可逆波に対して、共存する PQH₂ の濃度依存性を示した。PQH₂ の濃度増加に伴い、還元方向に一電子を保ったまま再酸化波が不可逆波に移行することが分かる。これは PQH₂ からスーパーオキサイドへの PCET 反応を示す特徴的な波である。また、図中に示すように、酸素の還元電位で測定した電解 ESR スペクトルは、対応するキノンアニオンラジカル (PQ⁻) のものであり、PCET 反応によって PQ⁻ が生成することが分かった。

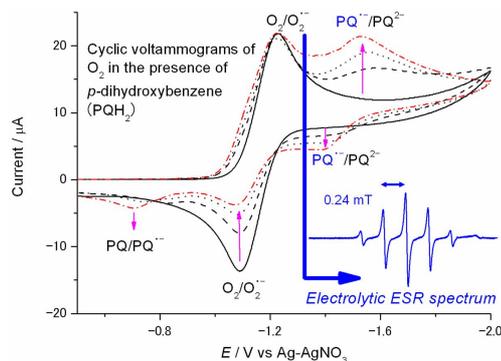


図 3 . PQH₂ 共存下における酸素還元波の変化および電解 ESR スペクトル

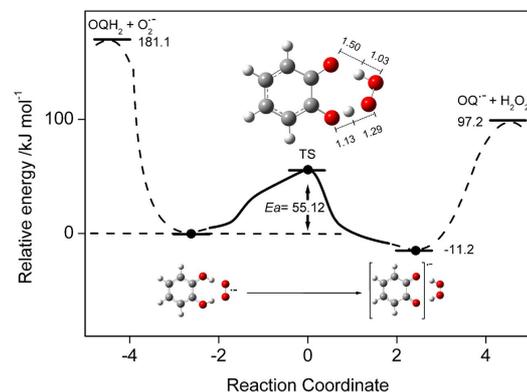


図 4 . カテコール (OQH₂) とスーパーオキサイドとの PCET 反応の DFT 計算による反応座標および遷移状態の構造。(反応の活性化エネルギーは 55.12 kJ/mol (水素結合) 程度)

図4は、スーパーオキサイドと OQH_2 から過酸化水素と対応するキノンアニオンラジカル($OQ^{\cdot-}$)が生成するPCET反応の反応座標をDFT計算によって得たものである。2つのプロトン移動と電子移動が1段階の反応で進行する協奏的2PCET反応であることを示している。また、DMPOを用いた競争的ESRスペクトル測定によっても、スーパーオキサイドやヒドロペルオキシラジカルなどの酸素関連ラジカルはトラップされず、キノンラジカルのみが観測され、実験的にも協奏的2PCET反応が明らかとなった。このような特徴的2PCET反応は、キノンラジカルがキノン-ヒドロキノン酸化還元対の安定中間体として存在することに起因しており、ヒドロキノンやカテコールおよびカテコール骨格を含む天然ポリフェノール類が、選択的にスーパーオキサイド消去に関わることでよく説明している。本研究では、スーパーオキサイド消去に関わるフェノールの構造特性を明らかにし、その反応メカニズムは協奏的2PCET反応であることを提唱した。

以上から、ヒドロキノンやカテコールおよびカテコール骨格を含む天然ポリフェノール類は、スーパーオキサイドと選択的に反応し、癌細胞の低電位、低酸素状態の細胞の認識部位として機能することを明らかとした。

以上、本研究では、電位応答型蛍光プローブの基本設計を可能とする、プローブ設計に用いられる蛍光部位と電位応答部位の架橋構造の役割、蛍光部位の特徴、および低電位を特異的に認識する電位応答部位の候補について新しい知見を与えた。これらの成果は、癌細胞の低酸素応答の特徴を明らかにする目的で使用される電位応答型蛍光プローブの設計のための基礎的知見として極めて重要であり、実際の応用されることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Tatsushi Nakayama, Bunji Uno, *Electrochim. Acta*, Concerted Two-proton-Coupled Electron Transfer from Catechols to Superoxide via Hydrogen Bonds, 査読有, **208**, 2016, 304–309.
DOI: 10.20431/2349-0403.0301002

Tatsushi Nakayama, Bunji Uno, *Int. J. Adv. Res. Chem. Sci.*, Structural Properties of 4-Substituted Phenols Capable of Proton-Coupled Electron Transfer to Superoxide, 査読有, **3** (1), 2016, 1–9.
DOI: 10.1016/j.electacta.2016.05.034

Tatsushi Nakayama, Bunji Uno, Importance of Proton-Coupled Electron Transfer from

Natural Phenolic Compounds in Superoxide Scavenging, *Chem. Pharm. Bull.*, 査読有, **63**, 2015, 967–973.

https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb/63/12/63_c15-00447/_pdf

〔学会発表〕(計6件)

戸倉茉諭美・山本拓平・中山辰史・江坂幸宏・宇野文二, 分子内光誘起電子移動における電子供与体と受容体間の相互作用に対する架橋構造の影響に関する研究, 第76回分析化学討論会, 2016.05.28-29, 岐阜薬大・岐阜大(岐阜県・岐阜市)

高野迪花・飯高美沙・中山辰史・山本拓平・宇野文二, アリール置換オルトカルボランの連続的二電子反応に関する研究, 第39回有機電子移動化学討論会, 2015.06.25-26, 長崎大(長崎県・長崎市)

中山辰史・宇野文二, フェノール類のPCET反応に基づくスーパーオキサイド消去の置換基効果に関する研究, 日本薬学会第135年会, 2015.03.25-28, 神戸学院大(兵庫県・神戸市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

宇野 文二 (UNO, Bunji)

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号: 80160307