

整理番号	H26-J-031	報告者氏名	片桐 洋史
------	-----------	-------	-------

研究課題名 分子間水素結合による構造制御に基づく新奇な蛍光色素の創出

<代表研究者> 機関名：山形大学大学院理工学研究科 職名：准教授 氏名：片桐 洋史

<共同研究者> 機関名： 職名： 氏名：
機関名： 職名： 氏名：
機関名： 職名： 氏名：
機関名： 職名： 氏名：

<研究内容・成果等の要約>

蛍光プローブを用いて目的のタンパク質や分子を可視化し、生命現象の空間と時間を捉える蛍光イメージングは、生化学・生物学だけでなく医学分野も含めた生命科学における重要技術である。本研究では、水素結合部位と折れ曲がり構造を持つ分子設計によって、高い安定性・水溶性・高い量子効率・大きなストークスシフト・固体凝集状態での発光を発現する新奇な蛍光性有機分子の創成について検討した。特に、p-ジアミノベンゼンのオルト位にメチルスルホニル基を導入した化合物が高い安定性と高い量子効率($\Phi = 0.7$)、固体蛍光性に加えて、フルオレセインと同等の蛍光波長(緑色・517 nm)、水溶性、さらには極めて大きなストークスシフト(140 nm)を持つことを見出した。興味深いことに、蛍光特性が溶媒の極性やpHに依存せず、あらゆる環境下で緑色発光を示す蛍光色素であることが明らかになった。理論計算による帰属から、基底状態と励起状態の双極子モーメントに違いが無いことがわかった。さらに、スルホニルアニリンがアミドに類似した性質をもつことが明らかになり、これらの結果を用いて蛍光特性を合理的に説明することができた。本成果は、*Angew. Chem. Int. Ed.* 誌に掲載され“Hot Paper”に選出された。また、有機合成化学上、極めて重要な化合物として *Synfacts* に掲載された。続いて、本化合物のアミノ基のアルキル化に成功した。本手法は、生体分子結合基として有用な N-ヒドロキシスクシンイミド活性エステル(NHS)の導入が可能なることから、標的分子のアミノ基に対する結合部位の導入につながる。また、アニリンの両オルト位にメチルスルホニル基を導入した化合物が水溶性を示し、高い安定性と高い量子効率($\Phi = 0.5$)、固体蛍光性に加えて、核選択性を有することを明らかにした。牛の卵母細胞の染色において明瞭なイメージ画像が得られたことから、本化合物が細胞の核染色に有効なことを見出した。

<研究発表（口頭、ポスター、誌上別）>

[学術論文]

1. Single Benzene Green Fluorophore: Solid-State Emissive, Water-Soluble, and Solvent- and pH-Independent Fluorescence with Large Stokes Shifts.
Beppu, T.; Tomiguchi, K.; Masuhara, A.; Pu, Y.-J.; Katagiri, H.*
Angewandte Chemie International Edition, **2015**, *54*, 7332-7335. Selected as "Hot Paper"
Highlighted in *Synfacts*, **2015**, *11*, 0711.

[招待・依頼講演]

1. 有機結晶学者からのメッセージ講演（新規な π 共役系材料の創成）
片桐洋史
第24回有機結晶シンポジウム・プレシンポジウム，広島大学，2015年10月31日
2. Sulfonylaniline-based fluorescent dyes: An effective push-pull system supported by intramolecular hydrogen bonding
片桐洋史
平成27年度 化学系学協会東北大会，弘前大学，2015年9月12日

[口頭発表]

1. スルホニルアニリン骨格を基盤とする push-pull 型分子の合成と構造および蛍光特性
別部輝生・富口絃輔・片桐洋史
日本化学会 第95 春季年会 (2015)，日本大学 理工学部船橋キャンパス，2015年3月27日

[ポスター発表]

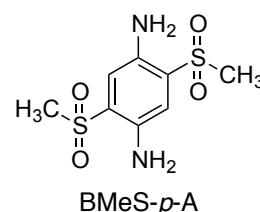
1. Molecular Design of Sulfonylaniline-based Fluorescent Dyes
Hiroshi Katagiri
ICCOSS 2015: 22nd International Conference on the Chemistry of the Organic Solid State
14 July, 2015, Niigata, Japan

<研究の目的、経過、結果、考察（5000 字程度、中間報告は 2000 字程度）>

【目的】 蛍光プローブを用いて目的のタンパク質や分子を可視化する蛍光イメージングは、どの生体分子が、いつ、どこで、どの分子と、どのような振る舞いをしているかを知ることができ、生体機能と疾病メカニズムの解明につながることから、予防・診断・治療といった医療技術への糸口となることが期待されている。蛍光イメージングに用いられる蛍光色素は、フルオレセインやローダミンなどの蛍光性有機分子と GFP などの蛍光タンパク質に大別される。蛍光タンパク質の最大の特長は、そもそも生体分子であるために生細胞・組織への影響が極めて少なく、比較的容易に生きたまま細胞内の標的タンパク質を蛍光標識することができる点である。しかしながら、蛍光タンパク質は分子サイズが大きく、標的分子本来の性質、挙動を阻害することが指摘されている。フルオレセインの分子量が 332 であるのに対し、GFP の分子量は約 27000 である。一方、蛍光性有機分子は化学的に結合させてタンパク質を蛍光標識する。分子サイズが格段に小さく、標的タンパク質の機能に与える影響は小さい。また、有機合成化学を駆使することで分子をチューニングし、バリエーションに富んだ化合物群を創製することができる。本研究では、オルト位にアミノ基とスルホニル基を持つ新規な蛍光性有機分子を創製し、蛍光イメージングへ応用することを目的とした。

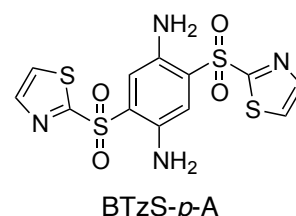
【結果と考察】 (1) 分子の構造チューニングによる長波長化： (a) メチルスルホニル基を持つ BMeS-*p*-A の蛍光特性：当初、チアゾリル基の導入とトリフルオロメチル基の導入を計画していたが、側鎖にメチルスルホニル基を持つ BMeS-*p*-A の蛍光特性において極めて重要な知見が得られたため、計画変更の手続きを行った上で本研究を優先して詳細な検討を行った。

その結果、BMeS-*p*-A が高い安定性と高い量子効率($\Phi=0.7$)を兼ね備えた緑色蛍光色素であることが明らかになった。水溶性で汎用の緑色色素であるフルオレセインと同等の発光波長(517 nm)をもちながらフルオレセインの約 6 倍の耐光性を有し、フルオレセインなどの多くの色素に見られる濃度消光を



示さず、溶液と固体の両状態において高い量子効率を示し、極めて大きなストークスシフト(140 nm)を持つ。特に、BMeS-*p*-A の蛍光特性は溶媒の極性や pH に依存せず、あらゆる環境下で緑色発光を示す蛍光色素であることが明らかになった。本性質は、これまでの蛍光色素とは一線を画す重要な特長である。単結晶 X 線構造解析の結果、アミノ基とスルホニル基間に明確な水素結合が形成され、相補的な分子間水素結合によってラダー型のパッキング構造を形成することが明らかになった。水素結合様式は Etter の経験則を完全に満たしていることから、本結晶は水素結合性結晶に分類されると考察した。分子間に顕著な π スタッキングは存在しない。従って、この分子間水素結合が固体蛍光に有利な結晶構造の形成が固体発光特性に寄与していると考えた。DFT 計算により BMeS-*p*-A の分子構造ならびに電子構造を求めたところ、基底状態と励起状態の構造に顕著な違いが見られた。BMeS-*p*-A の大きなストークスシフトはこの構造上の違いによって得られたと結論づけた。興味深いことに、基底状態と励起状態の両状態共に双極子モーメントはゼロ(0)であった。本計算結果は、溶媒の極性に依存しない BMeS-*p*-A の蛍光特性を支持している。また、 $^1\text{H-NMR}$ における BMeS-*p*-A のアミノ基のプロトンは低磁場(5.5 ppm)に現れた。本結果は、アミノ基とスルホニル基間の Push-pull 系の成立を示唆しており、アミノ基の電子密度の低下と水素結合の存在からアミノ基の塩基性は極めて低いことが明らかになった。以上の性質は BMeS-*p*-A の pH に依存しない蛍光特性を支持している。 (b) チアゾリル基を導入した BTzS-*p*-A の合成：Ullmann 縮合反応を用いて検討し

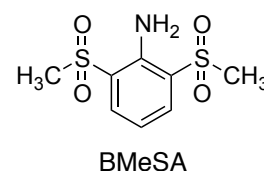
たが、2-ブロモチアゾールの反応性が低いことから一般的な反応条件では高い収率が得られなかった。種々検討した結果、最終的に多量の trans-1,2-シクロヘキサジアミン(50 eq)を用いることにより、良好な収率(70%)で目的物を合成することができた。また、アミノ基の脱保護反応には Schwartz 試薬を用いた。その結果、強酸や強塩基を用いることなく温和な条件下で N-アセチル基の脱保護に成功し、BTzS-pA を得ることができた。



BTzS-pA は吸収・蛍光スペクトルの長波長化を示したが、高い量子効率を得られなかった($\lambda_{\text{abs}} = 425 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 455 \text{ nm}$, $\Phi = 0.1$)。固体状態での量子効率も低く($\Phi = 0.1$)、単結晶 X 線構造解析の結果、相補的な分子間水素結合によってシート構造を形成することを確認した。スルホニルアニリン環の π スタックは確認されなかったが、チアゾリル基が J 会合体を形成していることが明らかになった。この J 会合体由来の構造が固体状態での低い量子効率に起因していると考えている。

(2) アミノ酸残基との反応部位の導入とイメージングへの応用：当初の計画通り、BMeS-pA に対してスクシンイミジル基の導入を検討した。まず初めに、モデル実験として BMeS-pA の N-アルキル化を検討した。ハロゲン化アルキルにオクチルブロマイドを用いて検討した結果、DMF 中 NaH を塩基に用いた場合と THF 中 n-BuLi を塩基に用いた場合の両方で BMeS-pA のアミノ基のプロトン引き抜きが確認され、DMF-NaH 系では目的物が収率 20% で得られた。しかしながら、THF-nBuLi 系ではアルキル化は進行しなかった。ここで、重要な知見として、BMeS-pA のアミノ基はスクシンイミジルエステルと反応しないことをモデル実験によって明らかにしている。これは、先に述べたとおり、BMeS-pA のアミノ基の塩基性が極めて低いことに起因している。そこで、DMF-NaH 系を用いてスクシンイミジルエステルのアルキルブロマイドとの反応を検討した。その結果、置換生成物は得られず、ハロゲン化アルキルのみが消費された。BMeS-pA がほぼ未反応の状態で見出されたことから、本反応において BMeS-pA のアニオンは置換反応を起こさずに基質に対して塩基としてのみ作用し、基質のスクシンイミジルエステル同士の副反応が進行したと考えている。従って、次にスクシンイミジル基をメチル基で置き換えた 3-ブロモプロピオン酸メチルとの反応を検討した。その結果、DMF-NaH 系において反応の進行が確認され、収率 20% で目的化合物を構成することができた。本結果によって、BMeS-pA のアミノ基の化学修飾法の確立に成功した。本結果によって、エステル基の導入ルートを確認することができた。また、今後は導入したメチルエステルの加水分解と続くスクシンイミジルエステル化を行うことで生体分子との結合形成を検討する。

(3) DNA プローブとしての機能評価：細胞核選択性と水溶性を兼ね備えた分子として、側鎖にメチルスルホニル基を持つ 2,6-ビスメチルスルホニルアニリン(BMeSA)の合成を検討した。これまでの研究から、アリール誘導体では 2,6-ジクロロニトロベンゼンと対応するチオラートを用いることで、高い収率で基本骨格を構築することができる。しかしながら、本反応において

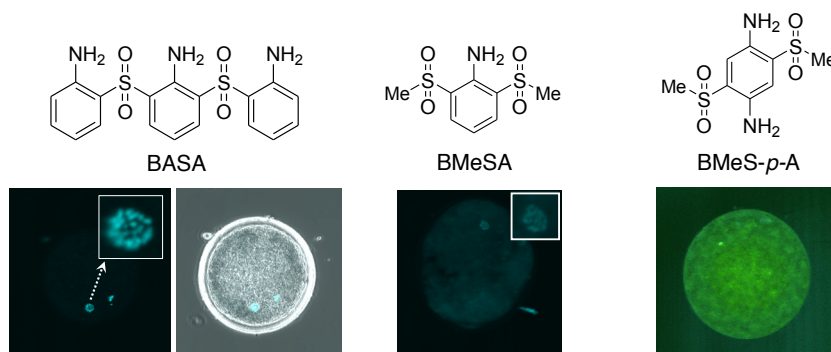


2,6-ジクロロニトロベンゼンを用いた場合、良い収率は得られなかった(収率 11%)。そこで、より脱離能が大きなフッ素を持つ 2,6-ジフルオロニトロベンゼンを用いて芳香族求核置換反応を行った。その結果、良好な収率で合成することができた。本結果はメチルチオラートの求核性がアリールチオラートよりも低いことを示唆しており、より脱離能に優れる 2,6-ジフルオロニトロベンゼンが本反応における基質として適することが明らかになった。続いて、ニトロ基を Pd/C を用いた接触水素化によってアミノ基に変換し、最後に m-CPBA を用いて硫黄原子を酸化する行うことで、目的とするスルホニルアニリン BMeSA を合成した。3 段階の反応で各反応の収率も良く総収率は 56% と良好であり、本合成経路を用いることで BMeSA を効率的かつ容易に合成することができることを明らかに

した。期待していた通り、BMeSAは640 mg/Lの蛍光イメージングに応用するに十分な水溶性と蛍光性を示した($\lambda_{\text{abs}} = 323 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 388 \text{ nm}$, $\Phi = 0.5$)。種々の溶媒を用いた吸収および蛍光スペクトルを測定し、相対法によって蛍光量子効率を算出した。その結果、吸収および蛍光スペクトルは共に溶媒の極性の影響をほとんど受けず、 $\Phi = 0.38\text{--}0.59$ の良好な蛍光量子効率を示した。これは溶液状態においても、アミノ基とスルホニル基間の分子内水素結合が保持されており、効果的にアミノ基の回転運動が抑制されているためと考察した。また、濃度消光を起こさず固体状態においても発光性であった($\Phi = 0.1$)。BMeSAのジクロロメタン溶液から調製した単結晶を用いて、X線構造解析を行い、結晶構造を決定した。その結果、他の類縁体と同様にアミノ基とスルホニル基の間に分子内水素結合を形成していることが明らかになった。また、本来アミノ基は sp^3 混成軌道であるが、本分子においてはほぼ sp^2 混成軌道の平面構造となっていた。本結果は、期待していた通り分子内水素結合によってアミノ基が制御されていることを支持している。さらに、BMeSAは2つのメチルスルホニル基がanti配座となる顕著な折れ曲がり型構造を示した。固体状態においても蛍光性が保持されたことを加味すると、このような嵩高い構造により、 π スタッキングがある程度抑制されていると推察される。しかしながら、ベンゼン環の面間距離は 3.44 \AA と比較的小さく、これは π - π 相互作用が働いている値として妥当である。以上の結果から、固体状態においては π スタッキングによる分子間エネルギー移動が生じることで、BMeSAの量子効率が低下したと考察した。次に、BMeSAの本質的な組織選択性を調査するために、固定化したウシの卵母細胞を用いた細胞染色を行った。MII期で固定化したウシの卵母細胞を、BMeSAのPBS溶液を用いて染色し、共焦点顕微鏡で観察を行った。また、細胞核選択性色素であるBASAおよびHoechst 33342を用いて染色した細胞との比較を行った。その結果、BMeSAを用いて染色した

細胞に、特徴的な斑点状の蛍光が見られた。これは核選択性色素を用いた場合と類似のシグナルであることから、BMeSAが核選択性を有することが示唆された。一方、BMeS-*p*-Aを用いた細胞染色においては、核や他の組織に対する選択性は確認されなかったが、極めて明瞭な細胞イメージを得ることが

できた。以上の結果から、アニリンの2,6-位にスルホニルを導入した骨格が細胞核選択性を示すことが明らかになった。さらに、BMeS-*p*-Aは核選択性を示さないが非選択的なイメージングに有効なことを見出した。細胞核選択性を示す化合物として、オリゴ芳香族アミド系化合物が知られている。これらの化合物は、一般的にDNAの副溝(minor groove)に親和性を示す。これは、アミド部位の窒素原子とDNAの各塩基が水素結合を形成するためとされる。アニリンの2,6-位にスルホニル基を導入した骨格が細胞核を認識する一つの可能性として、2-スルホニルアニリンが構造的にアミドと類似であることが挙げられる。しかしながら、現時点では本骨格が細胞核を染色する詳細なメカニズムの解明には至っていない。本研究結果によって、スルホニルアニリン骨格の核染色剤としての有用性を確立することができた。今後は、細胞核選択性の機構解明と色素の高性能化に重点を置いて研究を進めていく。



図：スルホニルアニリン型蛍光色素を用いた細胞染色