

学術交流・研究推進プロジェクト 成果報告書

研究代表者 所属 医薬分子化学研究室
職・氏名 教授・平野智也

研究テーマ：医療への応用を志向した特定の環境選択的に機能する光分解性保護基の開発

研究期間：

2019 年 4 月 1 日 ～ 2021 年 3 月 31 日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 平野 智也（大阪薬科大学・薬学部・教授）

研究分担者 （大阪薬科大学・薬学部・ ）

<共同研究機関>

研究代表者 影近 弘之（東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授）

研究分担者 （ 病院・ 薬剤部・ ）

研究目的：

光を利用した実験手法は生体機能の選択的な制御、解析を可能とする。そのためこれまでに、こうした手法に用いる様々な光機能性分子が開発されてきた。例えば、特定のイオン、酵素活性、がん組織などの測定対象を蛍光変化により検出する蛍光センサーは、生理機能解析、疾患診断に用いられている（図 1）。また、特定の波長の光照射により共有結合の切断反応が起こる光分解性保護基も開発されてきた。光分解性保護基を生理活性分子に導入した分子は Caged 化合物と呼ばれ、任意の時間と空間選択的に生理活性分子を生成させることを可能とする。その一方で、光照射のみによる制御では標的とする細胞内小器官、細胞、組織と、それ以外との区別をすることができない。そのため疾患治療薬に用いた際には、健常組織にも治療薬が作用し、副作用を引き起こす等の問題がある。本研究では、こうした問題を解決できる、特定の環境選択的に機能する光分解性保護基を開発する。開発した分子を、疾患組織選択的に治療薬を光放出するシステムなどに応用することを目指す。

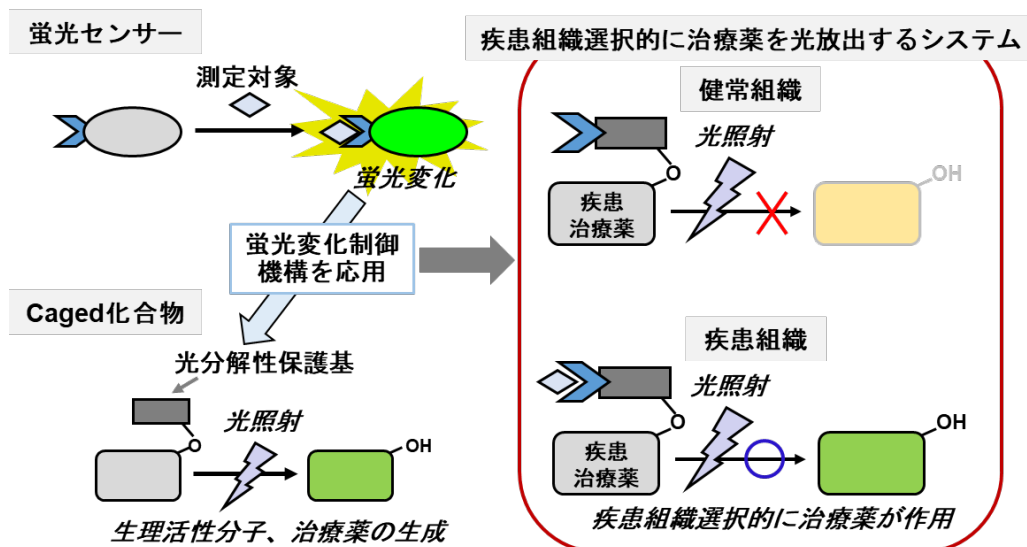


図1 本研究の概要

研究内容および研究成果：

1. 特定の pH 領域で機能する光分解性保護基の開発

特定の環境選択的な光分解性保護基としてまず、特定の pH 領域で機能する光分解性保護基の開発を行った。生体内における pH は、エンドソーム、リソソーム、ミトコンドリアなどの細胞内小器官毎に異なるだけでなく、がん組織近傍においては弱酸性になるなど、細胞、組織の状態に応じて変化する。そのため、特定の pH 選択的に機能する光分解性保護基は、生理機能解析および、図 1 に示す分子システムの構築に有用となる。

図 2 に示す Bhc は、光分解性保護基として汎用されている分子団である。我々はこれまで、Bhc の母核であるクマリン骨格を持つ、様々な蛍光センサーを開発してきた¹⁾。その結果、pH の変化に伴い、蛍光強度が OFF-ON-OFF と変化する蛍光センサー¹などを開発した^{2),3)}。pH の変化に伴い、蛍光強度が OFF-ON と変化する蛍光センサーはこれまで数多く開発され、様々な生理機能解析に応用されてきた。その一方で、OFF-ON 型のセンサーは、例えば pH6 以下の環境を検出することはできるものの、pH がさらに低下した環境とを識別することができない。一方、¹などの OFF-ON-OFF 型の変化を示し、特定の pH 領域を検出する蛍光センサーはこうした問題を解決した有用なセンサーとなりえる。我々は、センサーの機能を光分解性保護基に付与することができれば、特定の pH 領域で機能する光分解性保護基になりえると考えた。具体的には図 2 に示すように、センサー¹と Bhc の構造要素を組み合わせた化合物群²をデザインした。これらの化合物を合成し、pH を変化した際の光分解反応効率を HPLC により解析した。

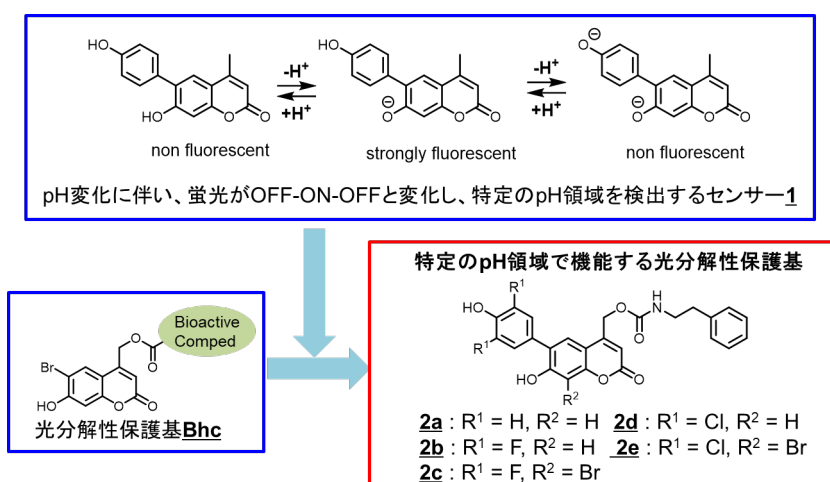


図 2 特定の pH 領域選択的に機能する光分解性保護基のデザイン

合成した **2** の機能を解析した結果、いくつかの化合物において、pH が増大するのに伴い、光分解反応効率が OFF-ON-OFF と変化することが明らかとなった⁴⁾。例えば、**2a** は pH 3、pH 6 では光分解反応が起こらないが、pH 9 では反応が進行し、pH 12 では進行しない (図 3)。さらに光分解反応が起こる pH は、導入したハロゲン原子の数、位置に応じて変化することも明らかとなった。すなわち、2 つの塩素原子と 1 個の臭素原子を有する **2e** では、pH 3 では光分解反応が起こらないが、pH 6 では進行し、pH 9 では起こらなかった。図 2 に示すように蛍光センサー **1** の蛍光強度変化は、二つの水酸基の脱プロトン化による制御される。すなわち、7 位の水酸基が脱プロトン化されたモノアニオン型で強い蛍光を持つが、6 位に導入したフェノール性水酸基も脱プロトン化され、ジアニオン型となると蛍光を失う。化合物群 **2** においても同様の脱プロトン化が起こり、モノアニオン型となったときに光分解反応が進行すると考えられる。また、モノアニオン型が存在する pH は、二つの水酸基の pK_a を変化させるハロゲン原子によって調整される。すなわち、**2a** では pH 9、**2e** では pH 6 と、光分解反応が起こる pH が変化したと考えられる。開発した光分解性保護基の中でも **2e** は、pH 6 というがん組織近傍で見られる環境で光分解反応が起こるため、がん選択的に治療薬を光放出する分子システムに応用できると考えられる。

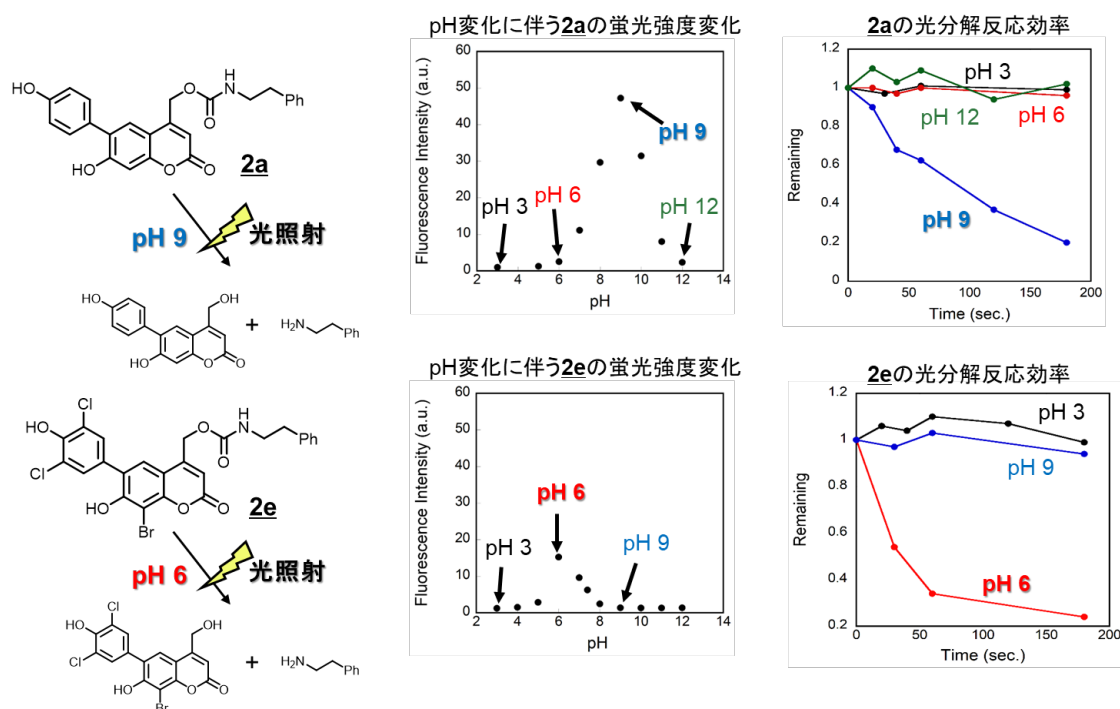


図3 化合物 **2** の機能解析

2. 活性酸素種存在下で機能する光分解性保護基の開発

活性酸素種は、生体に対して障害を与える因子としてだけでなく、生体内でのシグナル伝達分子として機能するなど多様な作用を持つ。そのため、活性酸素種存在下で機能する光分解性保護基は、生理作用解析のみならず、図1に示したような、活性酸素が関与する疾患の治療、保護に有用な分子システムに用いることができる。我々は、活性酸素種の中でも過酸化水素に着目し、2節で述べた研究と同様の戦略、すなわち蛍光センサーと **Bhc** の構造要素を組み合わせることによって、過酸化水素存在下で機能する光分解性保護基の開発を行った。これまでに報告されている過酸化水素を検出する蛍光センサーにおいては、ピナコールボランが過酸化水素により水酸基へと変換される反応が利用されている。我々は本反応をクマリン骨格に応用することにより、過酸化水素を検出する蛍光センサー **3** を開発していた (図4)。そこで、この蛍光センサーと光分解性保護基の構造要素を組み合わせた化合物 **4** を合成し、その機能を解析した。

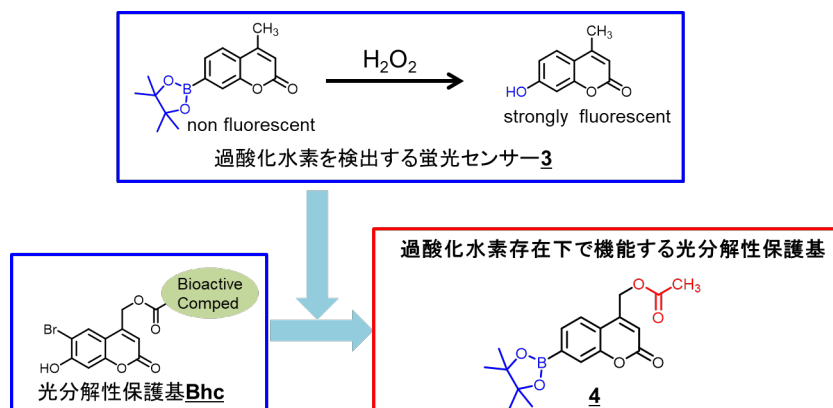


図4 過酸化水素存在下で機能する光分解性保護基のデザイン

種々の活性酸素存在下における、化合物 **4** の光分解反応効率を解析した結果を図 5 に示す。検討した活性酸素種の中で、過酸化水素存在下において、水酸基への構造変化と光分解反応によって生成する化合物 **6** が、最も高収率で得られた。選択性において改善の余地があるものの、化合物 **4** は過酸化水素存在下で機能する光分解性保護基になりえることが明らかとなった。

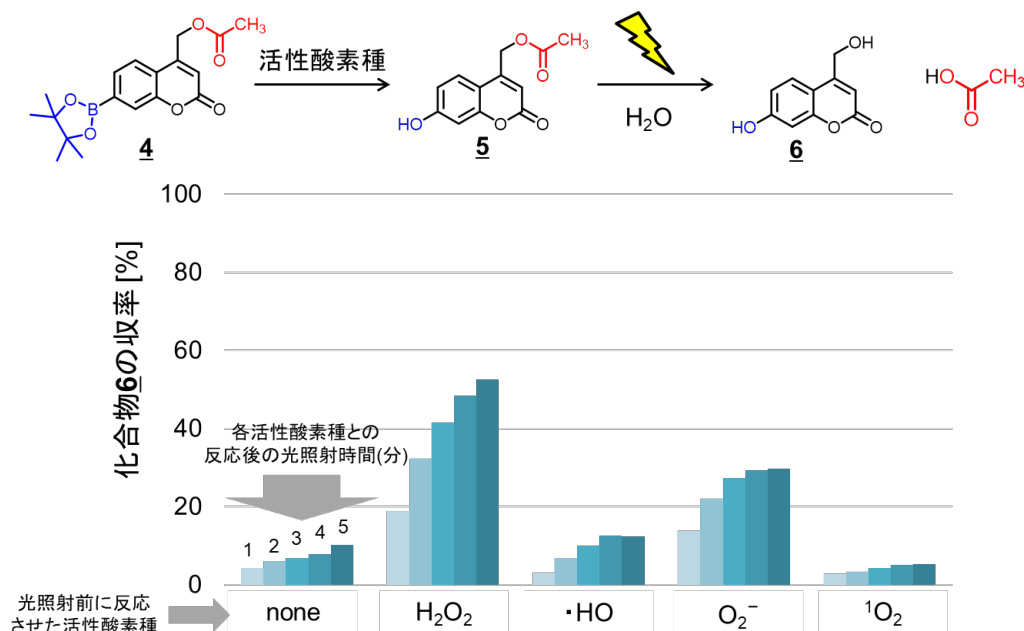


図 5 化合物 **4** の機能解析

本研究により我々は、蛍光センサーの構造とクマリン骨格を基に、特定の pH 領域または過酸化水素存在下で機能する光分解性保護基の開発に成功した。蛍光センサーの開発は現在、世界中で爆発的に進行しており、多種、多様のセンサーが報告されている。本研究の戦略にこうしたセンサーを用いることによって、個々の疾患特有の環境選択的に機能する光分解性保護基の開発は可能になると考えられる。こうした研究成果は、光を利用した治療、予防を行うための新たな分子システム開発の基盤となる。

成果発表：

<原著論文>

- 6-Arylcoumarin as a Scaffold of Photofunctional Molecules with OFF-ON-OFF Type Regulation. Daiki Kato, Takuya Shiraishi, Hiroyuki Kagechika, Tomoya Hirano. *J. Org. Chem.*, **86**, 2264–2270 (2021). (Selected as “Supplementary Journal Cover”)
- A Polarity - Sensitive Fluorescent Amino Acid and its Incorporation into Peptides for the Ratiometric Detection of Biomolecular Interactions. Hidetomo Yokoo, Hiroyuki Kagechika, Ayumi Ohsaki, Tomoya Hirano. *ChemPlusChem*, **84**, 1716-1719 (2019). (Featured in *ChemistryViews Magazine*, 15 December 2019 as “Fluorescent Peptides Help to Detect Biomolecular Interactions”)

<学会発表>

- 活性酸素存在下で機能する光分解性保護基の開発、加藤大輝、平野智也、影近弘之、日本薬学会第 141 年会、2021 年 3 月

- ・ OFF-ON-OFF 型制御により特定の pH 領域選択的に機能する Caged 化合物の開発、平野智也、加藤大輝、影近弘之、第 42 回日本光医学・光生物学会、2021 年 1 月
- ・ OFF-ON-OFF 型制御により特定の pH 領域で機能する Caged 化合物の開発、平野智也、加藤大輝、影近弘之、第 70 回日本薬学会関西支部大会、2020 年 10 月
- ・ *N*-メチルアデノシンを検出する有機化学反応の開発、上川拓也、平野智也、影近弘之、第 64 回日本薬学会関東支部大会、2020 年 9 月
- ・ 特定の pH 領域選択的に機能する光分解性保護基の開発、加藤大輝、平野智也、影近弘之、第 64 回日本薬学会関東支部大会、2020 年 9 月
- ・ *N*-メチルアデノシンを検出する有機化学反応の開発、上川拓也、平野智也、影近弘之、日本薬学会第 140 年会、2020 年 3 月
- ・ 生体内での環境変化に応答する光分解性保護基の開発、加藤大輝、山崎えりか、平野智也、影近弘之、日本薬学会第 140 年会、2020 年 3 月
- ・ OFF-ON-OFF 型制御により特定の pH 領域選択的に機能する光分解性保護基の開発、加藤大輝、平野智也、影近弘之、第 43 回反応と合成の進歩シンポジウム、2019 年 11 月
- ・ 蛍光性天然物を基にした新規環境応答型蛍光物質の開発と応用、平野智也、横尾英知、大崎愛弓、影近弘之、第 69 回日本薬学会関西支部大会、2019 年 9 月
- ・ *N*-メチル化リシン選択的結合反応に基づくヒストンメチル化酵素活性の蛍光検出法の開発と応用、平野智也、岡崎優祐、森修一、影近弘之、第 11 回バイオ関連化学シンポジウム、2019 年 9 月
- ・ 弱酸性環境選択的に機能する光分解性保護基の開発、加藤大輝、平野智也、影近弘之、日本ケミカルバイオロジー学会 第 14 年会、2019 年 6 月

<その他>

なし