

## 1. 研究テーマ

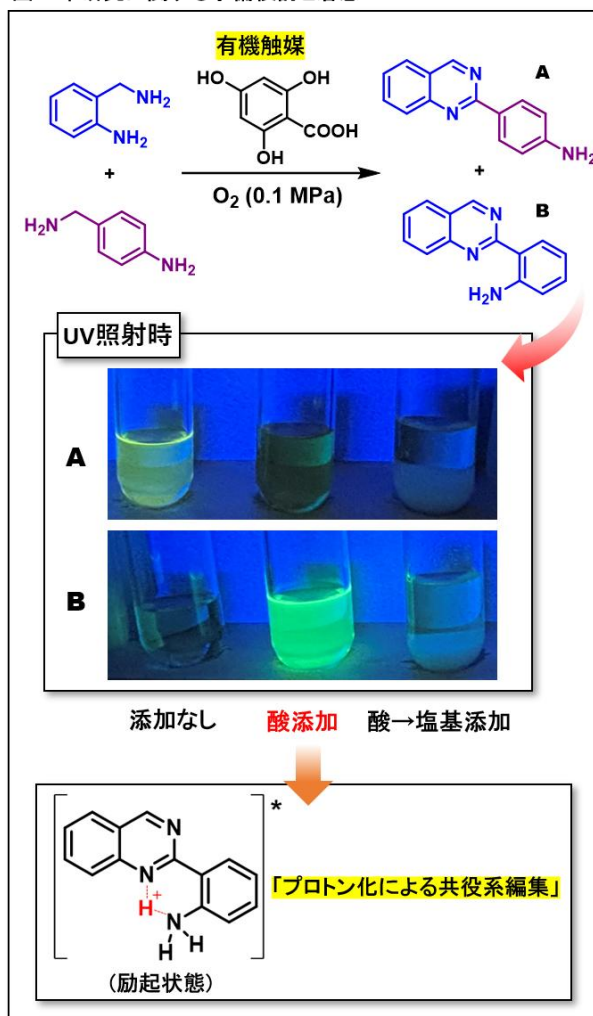
「プロトン化による共役系編集」を軸とした分子設計による pH 応答水溶性緑色発光色素の精密設計法の開発

## 2. 研究背景と本研究の目的

がんは我が国において死因の第1位であり、山梨県においても毎年 6000 人以上が新たに罹患している。また、高齢化社会が進行する現代において、がんはより身近な病となっており、がん対策の重要性が日々増大している。一方、現代の医療においてがんは必ずしも不治の病というわけではなく、早期発見と治療によって病状の回復・完治の可能性が大いに高まる。このような観点から、分子レベルで機能を付与できる有機合成化学の利点を活かし、迅速ながん診断が可能な化学センサーの開発が求められている。従来のがん診断では、生体組織を切除する病理検査や X 線照射、放射性薬剤投与などが必要であり、患者への身体的負担やコスト面での課題がある。そのため、身体への負担が少ないがん診断を実現するために、蛍光性物質を含んだ診断薬の開発が進められている。蛍光性物質は特定の光に反応して発光する性質を有しているため、薬剤骨格に組み込み光照射を行うことで薬剤の分布を細胞内で分析することが可能である。しかし、蛍光性物質の多くは水溶性が非常に乏しいため、従来の診断薬の多くは複雑で多段階合成が必要な蛍光性構造と水溶性官能基を連結した分子設計が中心であった。

本申請者はこれまでに触媒反応やラジカル反応を駆使することで、発光材料創製の基盤骨格である含窒素  $\pi$  共役系分子の環境にやさしい合成法の開発を中心に研究を展開してきた。最近、本申請者は有機触媒を用いたグリーン酸化により 2 種類の異なるベンジルアミン誘導体からキナゾリン骨格を直接合成できる手法を開発した。そこで、本手法の応用として *o* 位・*p* 位それぞれにアミノ基を有する 2 種類のベンジルアミン誘導体を本条件で反応させたところ、2 種類のキナゾリン誘導体 **A**, **B** が得られた。それぞれの反応性を調査したところ、驚くべきこと

図1. 本研究に関する予備検討と着想



にキナゾリン骨格に近い位置にアミノ基を有する **B** のみが酸添加によって水溶性と鮮やかな緑色発光を示した。また、塩基を加えることで消光したことから、本発光はアミノ基と芳香環上の窒素原子上での可逆的な「プロトン化による共役系編集」が関与していると推定される (図 1)。一方、がん細胞自身を取り巻く微小環境では生体内で pH = 6.5 前後と正常組織と比べ大きく酸性化することが知られている。そこで本申請者は、これまでの研究によって見出した「プロトン化による共役系編集」を軸とする分子設計によりがん進行に伴う生体内での pH 変化に敏感に応答し発光強度を増大する革新的な水溶性蛍光色素の精密設計法の開発を計画した。

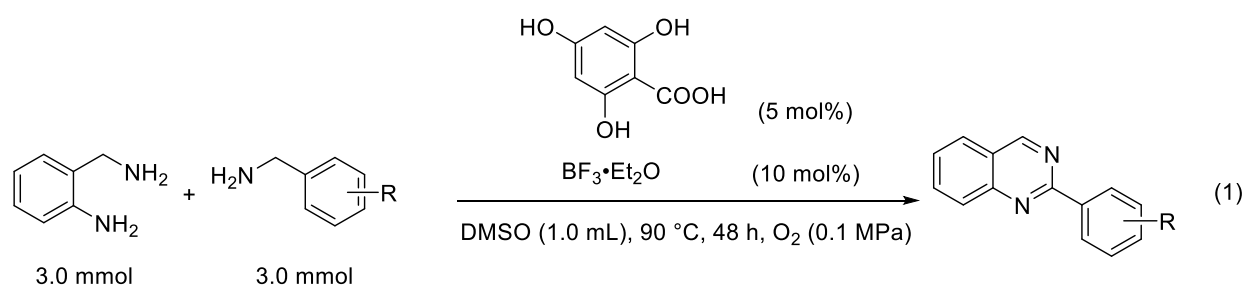
本研究では、有機触媒を用いたアミン類の酸化的カップリングおよび遷移金属触媒によるクロスカップリング反応を駆使して、含窒素ヘテロ環構造の近傍にプロトン捕捉が可能なアミノ基を有する芳香族骨格を導入した分子を合成し、pH 変化に鋭敏に応答することで優れた発光性を発現する新規分子指示薬の精密設計法を開発する。分子構造の違いによる発光挙動の pH 応答性の変化や発光色の関係性を解き明かすとともに、がん細胞がグルコースなどの糖類を通常細胞に比べてより多く取り込む特性(Warburg 効果)に基づき、開発した色素前駆体骨格に糖鎖ユニットを連結させたがん診断薬の合成を目的とした。

### 3. 研究方法

弱酸性～強酸性の水溶液に溶解して初めて強く発光するアミノ基と含窒素芳香環を含んだ機能性色素を有機触媒や遷移金属触媒を用いた有機合成により合成し、がん診断への応用に向けて pH 応答性や発光メカニズムの基礎研究を進めた。また、他の含窒素ヘテロ環類に酸応答性部位を導入した物質を合成し、本研究の標的骨格との酸応答性挙動の違いについても詳細に検討を行った。

### 4. 研究成果

本研究では母骨格としてキナゾリン骨格に注目している。キナゾリン誘導体は優れた電子アクセプター能を有する含窒素ヘテロ環の一つであるが、従来合成されてきたほとんどの誘導体は Brønsted 酸により発光特性が著しく低下し消光してしまうということが知られていた。しかし、官能基導入による酸応答性の挙動変化については詳細な検討は皆無であった。そこで、まず本研究では多種多様な官能基を導入したキナゾリン誘導体を合成し、それぞれの酸応答性を比較することで、「酸に応答して消光しない」かつ「鋭敏に応答して発光性が増大する」分子骨格の探索から実施した。合成には本申請者らがこれまでの研究で独自に開発を進めてきたサリチル酸誘導体を有機触媒とするアミン類の常圧酸素酸化によるイミン形成を鍵とする分子構築法を適用した (式 1)。



本手法により 21 種類の多種多様なキナゾリン誘導体、および類似骨格を有するキナゾリノン誘導体などを合成し、アセトンに溶解させたサンプルについて 10%塩酸を添加し、酸応答性を比較した。その結果、いくつかの誘導体が酸と特異的に反応して発光強度を増大した (図 2)。

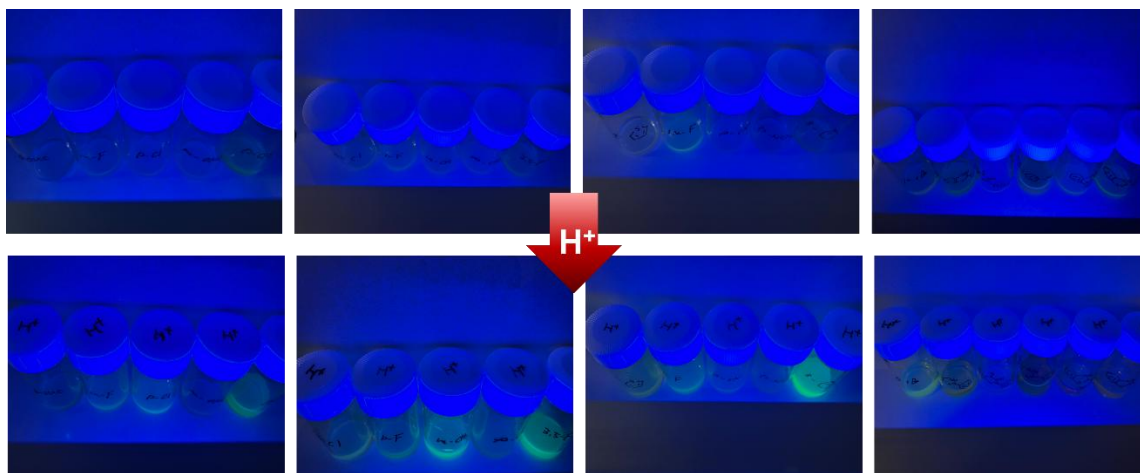


図 2. 各種キナゾリン誘導体における 10%塩酸添加前後の 365 nm 紫外光照射時の発光挙動

そこで測定条件を統一してそれぞれの応答性を比較したところ、特定位置にアミノ基を有する誘導体のみが著しく発光強度を増し鮮やかな緑色発光を示すことが明らかとなった (図 3)。

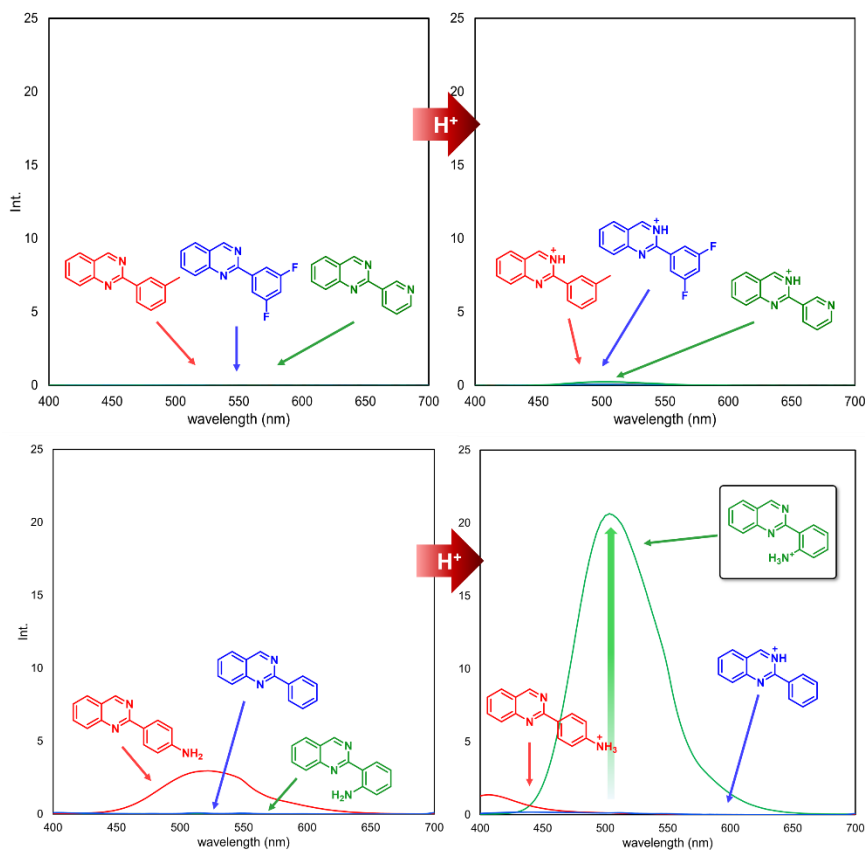


図 3. 0.1 M HCl aq.添加による蛍光発光挙動の変化 ( $\lambda_{ex} = 350 \text{ nm}$ ,  $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ )

本研究で見出した特異的に発光するキナゾリン分子である 2-(2-quinazolinyl)aniline について、Brønsted 酸添加量による発光強度の変化を確認した。キナゾリン誘導体をアセトンに溶解させたサンプルについて、*p*-TsOH 水溶液を添加すると、最大発光波長  $\lambda_{em} = 505 \text{ nm}$  で発光強度が大きく増大していく様子が観測された (図 4)

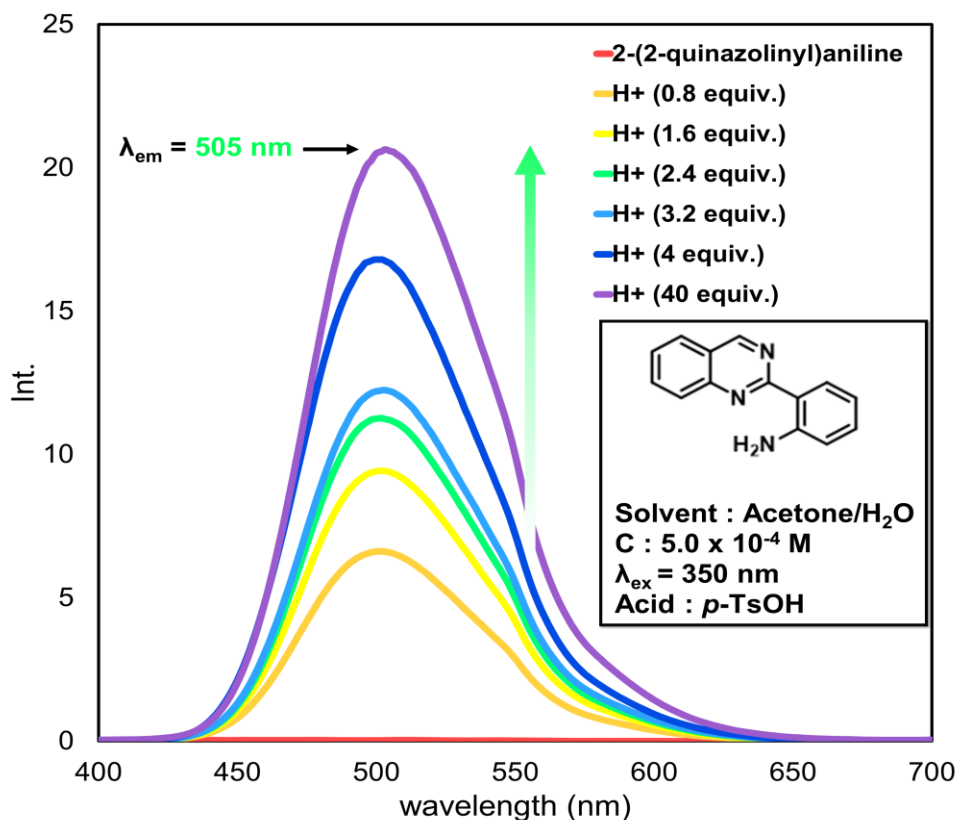
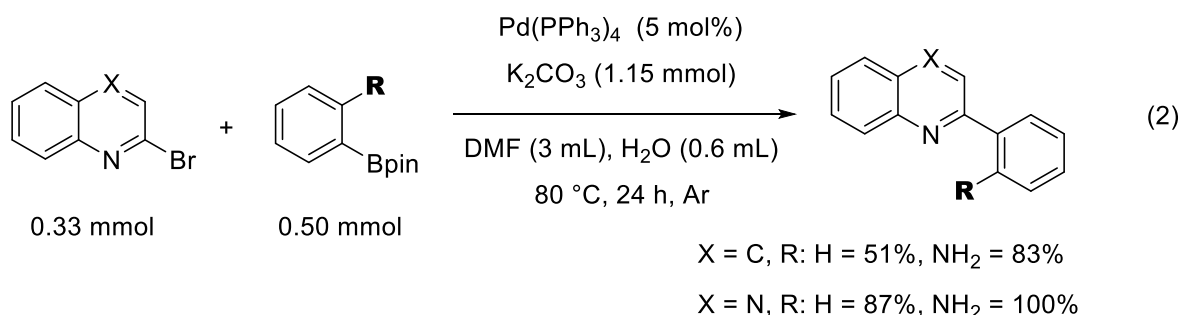


図 4. Brønsted 酸添加量による発光強度の変化

続いて、発光挙動に対する母骨格である含窒素ヘテロ環の構造の寄与を確認するため、窒素の位置が異なるキノキサリン誘導体や窒素が1つであるキノリン誘導体を鈴木・宮浦クロスカップリングにより合成した (式2)。



これらについても酸応答性を検討したが、いずれもほとんど発光しない、または完全に消光されてしまった。この結果から、本研究で見出したアミノ基導入による発光特性の変化は基盤であるキナゾリン骨格もまた重要な役割を果たしていると推察された (図 5)。

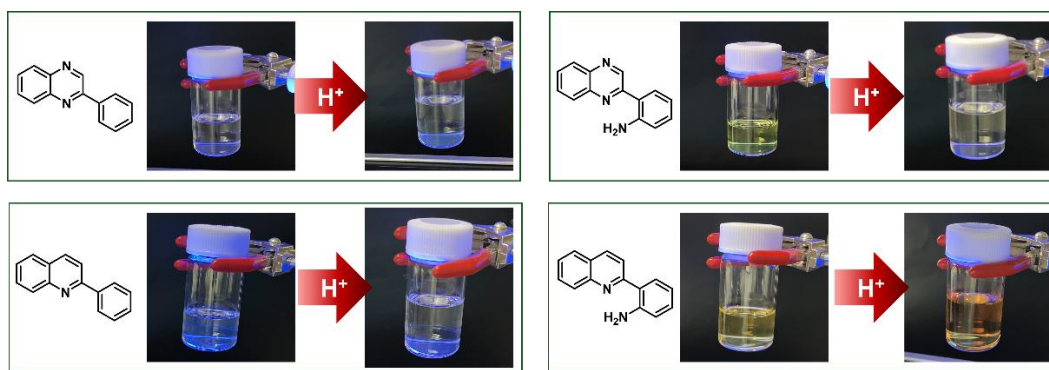


図 5. アミノ基導入含窒素ヘテロ環およびその類縁体の Brønsted 酸添加による発光変化の様子

酸の強さ (pH)や溶媒効果と発光特性についても検討したところ、本発光特性は強酸性の酸存在下およびプロトン性極性溶媒 (とりわけ H<sub>2</sub>O)中で極めて円滑に発現することを見出した (図 6)。

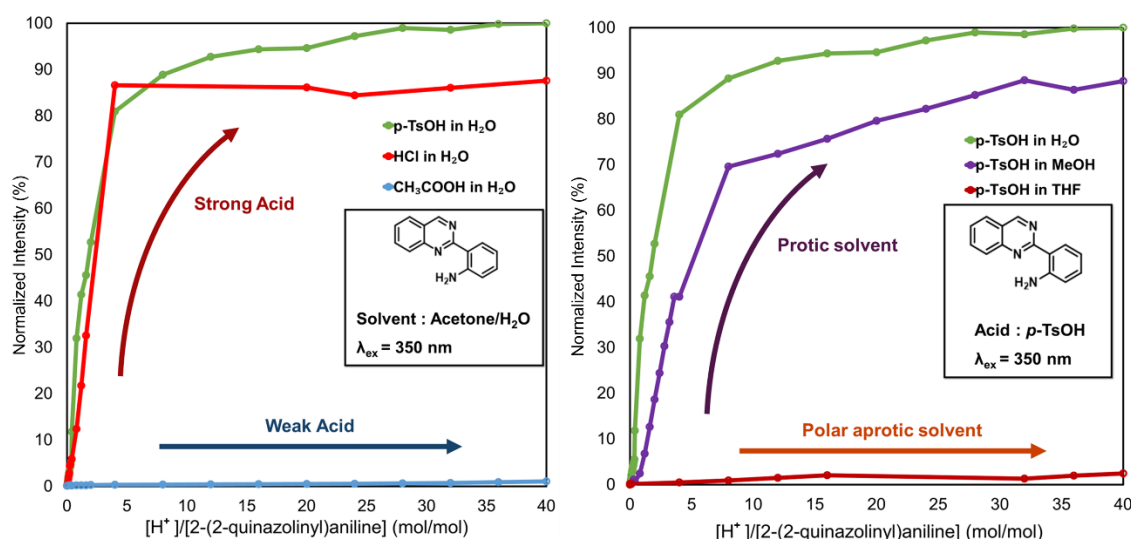


図6. アミノ基導入キナゾリン誘導体の酸応答性評価 (酸の種類・溶媒効果)

また、酸添加後に発光した状態に弱塩基を加えると蛍光発光はほぼ完全に消え、続けて酸を添加すると発光性が回復するといった、発光の ON/OFF の繰り返し性についても確認することができた (図 7)。

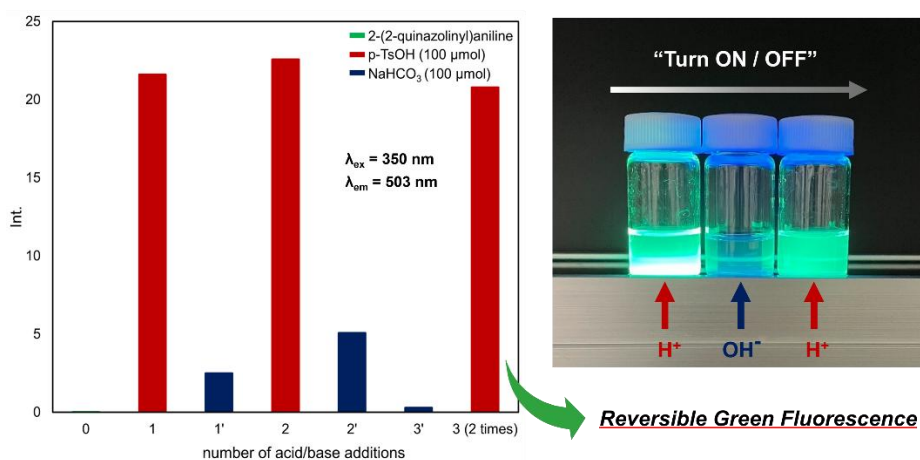
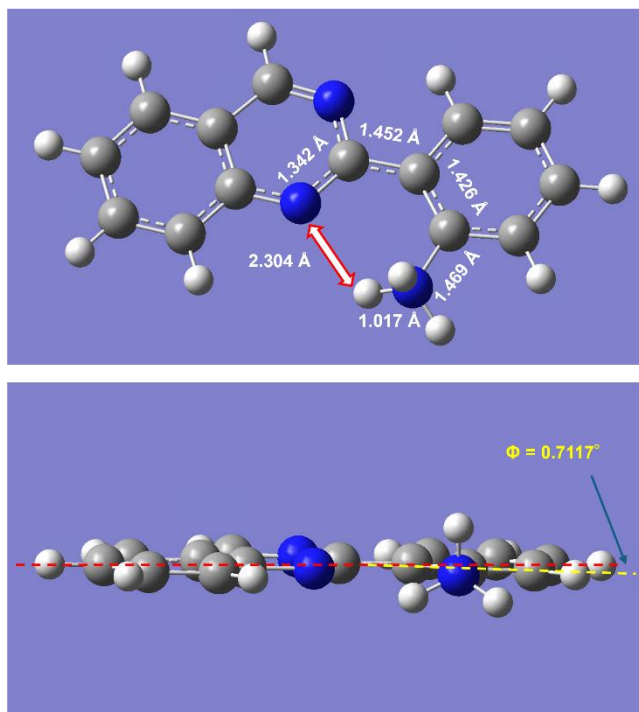


図7. アミノ基導入キナゾリン誘導体の酸応答蛍光スイッチング



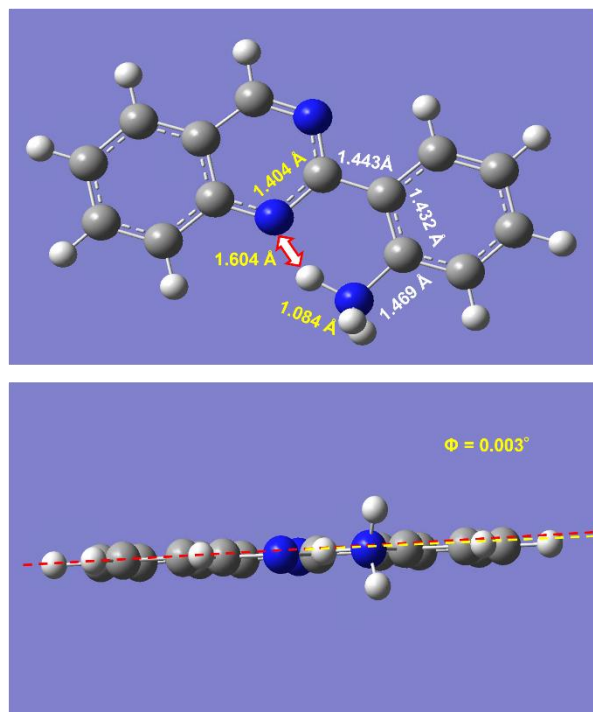
本研究で見出したアミノ基修飾キナゾリン分子の酸応答による発光性増大に関するメカニズムについて、Gaussianを用いたDFT計算による詳細な分析を実施した。H<sub>2</sub>O溶媒中での基底状態と励起状態の最安定構造最適化を行ったところ、基底状態で既にキナゾリン環の窒素とプロトンが付加したアミノ基との間で相互作用が見られ、キナゾリン環とアミノ基が導入されたベンゼン環の二面角が0.7117°であった。興味深いことに、励起状態ではさらにその相関が増大し、キナゾリン環上の窒素-プロトン化アミノ基間の原子間距離が1.604 Å、二面角が0.003°となった。一般に、蛍光物質の発光強度はより平面性の高い $\pi$ 共役系となるほど増大することから、本研究で見出した酸応答性はこれに由来するものであると示唆された。また、アミノ基を有さない2-phenylquinazolineや比較検討で合成した類縁体の酸付加体は基底状態・励起状態ともに母骨格である含窒素ヘテロ環と置換基が導入されたベンゼン環との二面角が非常に大きくなっており、 $\pi$ 共役系全体が捻じれた構造になっていることが計算によって判明した。この結果から、本手法の特異性と有効性が明確になった(図8)。

S<sub>0</sub> (基底状態)



B3LYP/6-31G(d,p) in H<sub>2</sub>O (SMD)

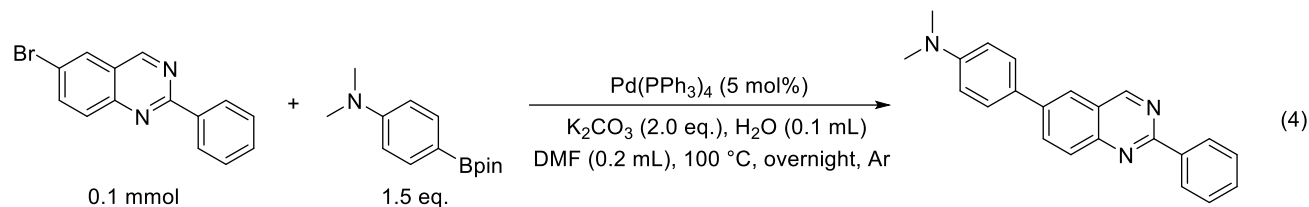
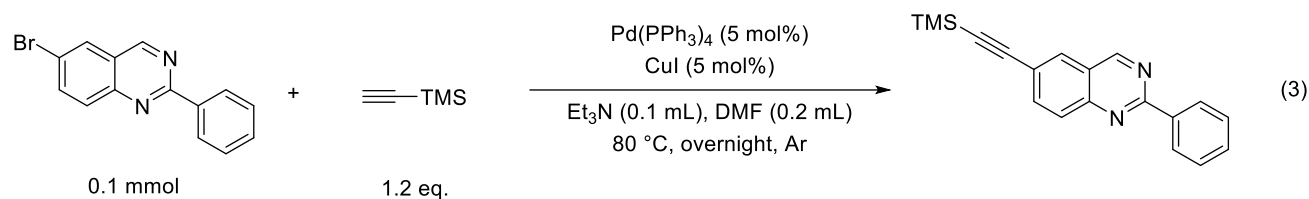
S<sub>1</sub> (励起状態)



TD-B3LYP/6-31G(d,p) in H<sub>2</sub>O (SMD)

図8. アミノ基修飾キナゾリンの酸添加による発光挙動の計算化学による分析結果

さらに、がん細胞の生体プローブとして本研究で見出した蛍光スイッチング骨格を組み込んだ新規キナゾリン誘導体の合成を進めるために、キナゾリン骨格にハロゲン基が導入された分子を合成し、各種クロスカップリング反応に対する反応性を検討した。トリメチルシリルアセチレンを用いた菌頭カップリング反応や電子ドナー性の官能基を有するボロン酸を用いた鈴木・宮浦クロスカップリング反応について本基質は適用可能であり、対応するクロスカップリング体の生成をNMR測定および精密質量分析により確認した(式3, 4)。



## 5. 今後の展望

今後は本研究で明らかとなった酸応答蛍光スイッチング分子の pH 応答性をさらに高め、生体内での利用に向けてより弱酸条件での応答性を向上できるような分子設計を進める予定である。また、がん細胞の *in vivo* 分析に向けた糖連結センシング分子について菌頭カップリング反応で合成した分子を起点として検討を継続し、実用化を目指す。一方、本研究で見出した蛍光スイッチング分子であるアミノ基修飾キナゾリンに対して  $\pi$  共役系をさらに組み込むことで、酸応答による発光色の自在な調整を可能とすることを目指していく。

## 6. 研究成果の発信方法 (予定を含む)

学会発表:

- 小中澤 優貴, 山本結生, 「Brønsted 酸添加により可逆的に緑色発光するアミノ基修飾キナゾリン誘導体の合成と光学特性評価」 日本化学会第 105 回春季年会 (2025), ポスター発表, [PB]-2vn-39, 2025 年 3 月

現在、本研究により得られた成果を国際学術誌の学術論文として投稿準備中である。