

論文の内容の要旨

論文題目 新規9位修飾ピロニンY誘導体の光学及び構造特性の
解析とその応用

氏名 富田 淑美

【序論】キサンテン環誘導体は古くから利用されてきた蛍光性の有機小分子であり、現在に至るまで蛍光化合物として広く利用されてきた。これまでに開発されてきたキサンテン環誘導体は9位にベンゼン環を有するものがほとんどであるが、9位にベンゼン環を持たないキサンテン環誘導体も少数ながら知られている。例えば9位にシアノ基を有するローダミン800は、同じキサンテン環構造を有するローダミン101と比較して約120 nmも長い波長領域に吸収及び蛍光発光を有する色素であり、この9位置換基の違いによる光学特性の変化は極めて興味深い (Figure 1)。

そこで私はキサンテン環9位に様々な置換基を導入した新規ピロニンY誘導体を合成し、9位置換基が光学的、構造的特性に及ぼす影響を調べると同時に、それらの知見を利用した新規蛍光プローブの開発を目的として本研究に着手した。

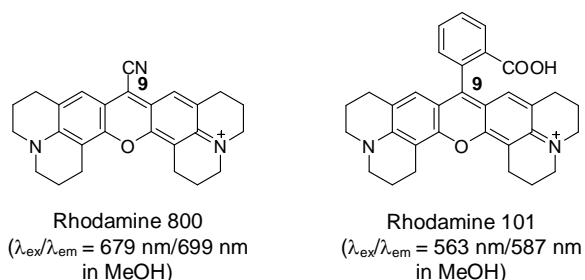
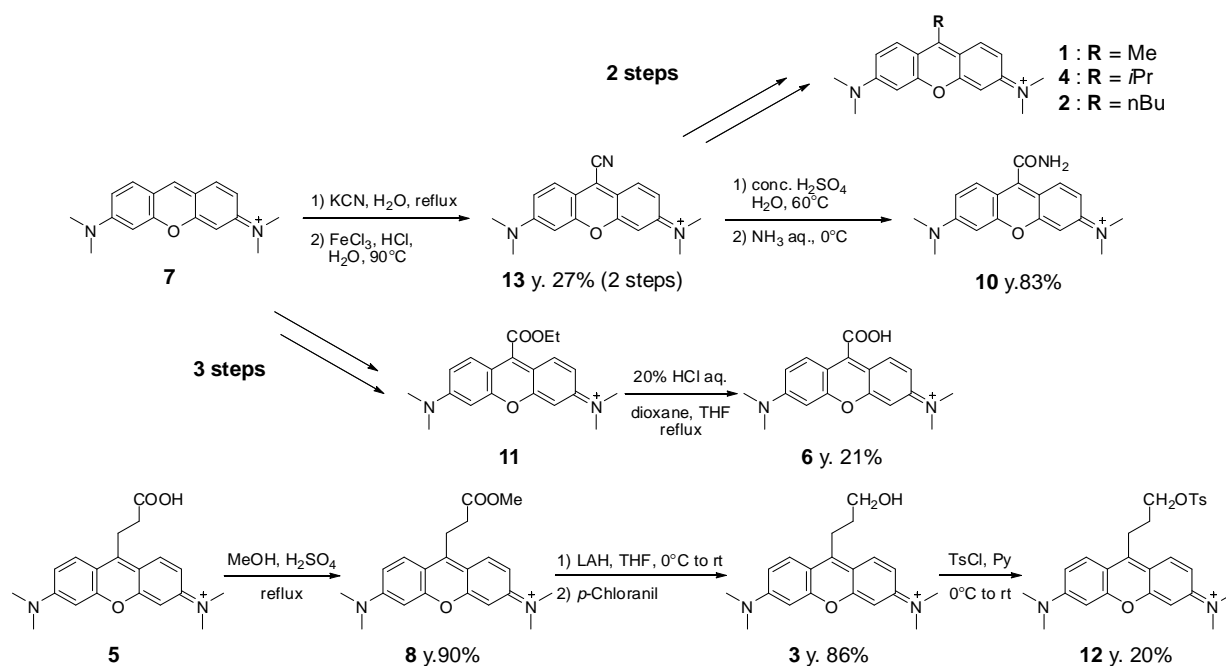


Figure 1. Chemical structures of rhodamine 800 and rhodamine 101.

【本論】

1. 9位修飾ピロニンY誘導体の合成

キサンテン環の光学特性に9位置換基が及ぼす影響について調べるため、ピロニンY (7) を出発原料として、9位に様々な置換基を導入した誘導体を合成した (Scheme 1)。



Scheme 1. Synthetic schemes of pyronin Y derivatives.

2. 9 位修飾ピロニン Y 誘導体の光学及び構造特性の解析

2-1. 光学特性の解析

合成したピロニン Y 誘導体に加えて既知化合物である 9-フェニルピロニン Y (9) を合成し、9 位修飾ピロニン Y 誘導体の光学特性を調べ、その性質を比較した (Table 1)。

その結果、9 位に電子吸引性の置換基を有するピロニン Y 誘導体は、無置換のピロニン Y 誘導体よりも長波長側に、電子供与性の置換基を有するピロニン Y 誘導体は無置換のピロニン Y 誘導体よりも短波長側に極大吸収を示した。その傾向として置換基の電子吸引性が大きければ大きいほど吸収波長がレッドシフトすることが明らかになった。

Table 1. Photochemical properties of pyronin Y derivatives.

Compounds	R	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ (nm) ^a	Stoke's shift (nm)	ϕ_{FL} ^{a,b}
1	Me	536/557	21	0.36
2	nBu	537/556	19	0.46
3	CH ₂ CH ₂ CH ₂ OH	540/560	20	0.38
4	<i>i</i> Pr	540/563	23	0.39
5	CH ₂ CH ₂ COO ⁻	543/563	20	0.46
6	COO ⁻	545/585	40	0.20
7	H	546/563	19	0.39
8	CH ₂ CH ₂ COOMe	547/567	20	0.39
9	Ph	548/571	23	0.32
10	CONH ₂	568/604	36	0.10
11	COOEt	575/n.d. ^c	—	< 0.001
12	CH ₂ CH ₂ CH ₂ OTs	587/610	23	0.35
13	CN	654/671	17	0.033

^aMeasured in 0.10 M sodium phosphate buffer at pH 6. ^bFor determination of the quantum efficiency of fluorescence (ϕ_{FL}) except for 12 and 13, rhodamine B in EtOH (ϕ_{FL} = 0.65) was used as a fluorescence standard. Regarding 12 and 13, cresyl violet in MeOH (ϕ_{FL} = 0.54) was used as a fluorescence standard. ^cNot detected.

また、**11** 以外のピロニン Y 誘導体は全て蛍光性を示した ($\phi_{FL} = 0.033-0.39$)。

2-2. 構造特性の解析

12 は pH 6.0 の水中においてキノイドフォーム (**12a**) に由来する吸収スペクトル ($\lambda_{abs} = 587 \text{ nm}$) を示す。一方、**12** の重メタノール中での $^1\text{H NMR}$ スペクトルは、他のピロニン Y 誘導体と大きくシグナルが異なり、**12** はキノイドフォーム (**12a**) ではなく 9 位に特徴的なエチレニックフォーム (**12b**) をとることが示唆された (Figure 2)。

そこでエチレニックフォームがキノイドフォームのアルキル鎖 1 位炭素からのプロトンの脱離により生じると考え、重 DMF 中において **2** に塩基であるトリエチルアミンを添加し $^1\text{H NMR}$ を測定したところ、キノイドフォーム (**2a**) 由来のピークが消失し

スペクトルの変化として、エチレニックフォーム (**2b**) に特徴的なピークの出現が確認された。また、**2b** 由来のピークは酸であるトリフルオロ酢酸を添加することによって消失し、それに伴い **2a** 由来のピークが現れた (Figure 3)。

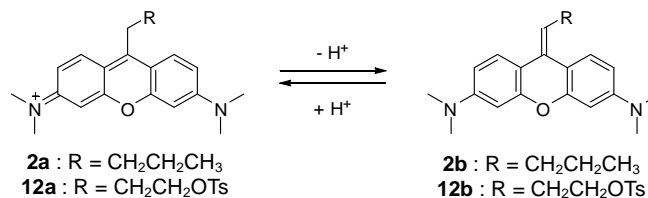


Figure 2. Acid-base equilibrium of **2** and **12**.

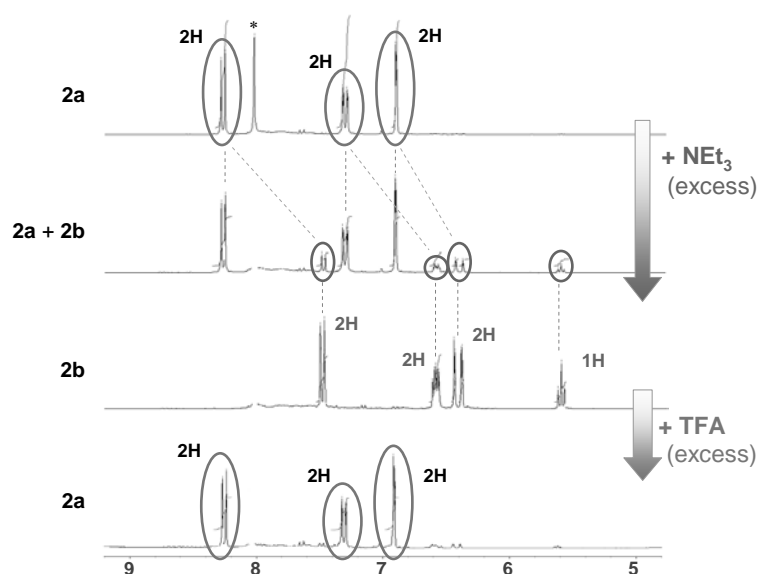


Figure 3. $^1\text{H NMR}$ analysis of acid-base equilibrium of **2**. The DMF-d7 peak has been removed (*) to simplify the spectra.

3. 9 位修飾ピロニン Y 誘導体の蛍光プローブへの応用

蛍光プローブとは標的分子の濃度や活性を蛍光特性の変化として検出する有機分子の総称であり、生細胞における生命現象を非侵襲的に解明するための強力なツールである。上述の光学特性を、標的分子との反応前後での蛍光性を変化させる方法として利用し、蛍光プローブの開発を行った。

3-1. エステラーゼプローブの開発

Table 1. に示すように9-エトキシカルボニルピロニン Y (**11**) は無蛍光性、9-カルボキシピロニン

Y (6) は蛍光性である。この性質を利用し、エステル加水分解により蛍光性を獲得する蛍光プローブの創製を試みた。具体的には、エステル部位を様々なエステラーゼに対して高い反応性を示すアセトキシメチル (AM) エステルに変えた、9-AM カルボニルピロニン Y (14) を合成した。14 は、ブタ肝臓エステラーゼでの機能評価から、エステラーゼプローブとして機能することが明らかになった (Figure 4)。

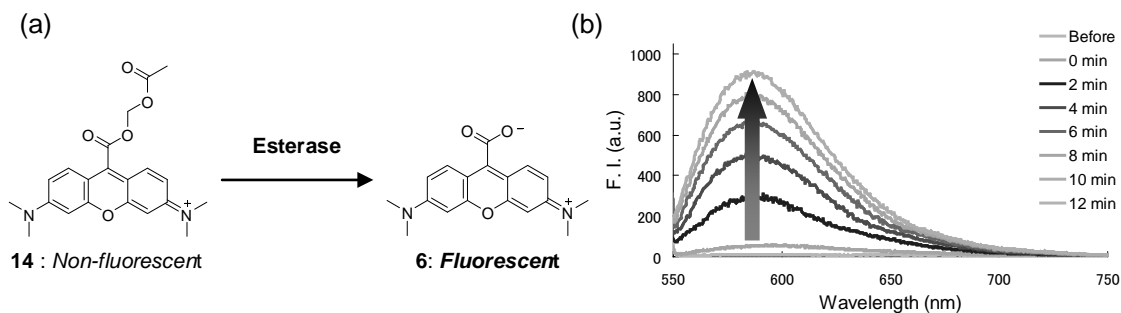


Figure 4. (a) Enzymatic reaction of 14 with esterase. (b) Fluorescence spectral change of 14 after addition of porcine liver esterase (0.1 units/mL).

3-2. ニトリルヒドラーゼプローブの開発

工業的にアクリロニトリルから生産されているアクリルアミドは大変有用な合成繊維の製造原料である。その生産には、微生物が産生するニトリルをアミドに変換するニトリルヒドラーゼを利用する方法が用いられており、より高活性な酵素を見出すことは製造効率の向上につながる。微生物に対し、ありのままの状態での酵素の発現を確認し、選別する方法が確立できれば、より高活性な酵素を探索する研究においてスループットの向上が期待できる。

そこで、9-シアノピロニン Y (13) と 9-カルバモイルピロニン Y (10) の吸収・蛍光波長及び蛍光量子収率などの光学特性が大きく異なることに着目し、13 がニトリルヒドラーゼを標的とする蛍光プローブとして、ニトリルを水和する酵素反応を検出可能かどうか機能評価を行った。実験の結果、13 はニトリルヒドラーゼの基質となり、10 に変換されることによって、その蛍光性が大きく変化することが判明した (Figure 5)。

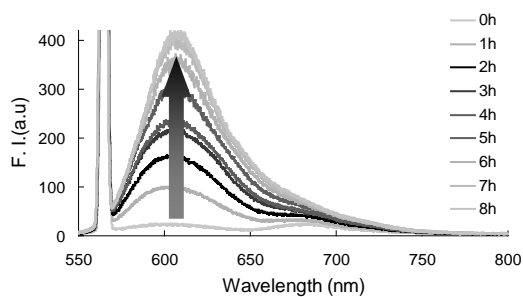


Figure 5. Time course of fluorescence spectral change of 13 after addition of *Rhodococcus rhodochrous* lysate including expressed nitrile hydratase. Fluorescence was measured with excitation at 565 nm.

【結論】私は新規 9 位修飾ピロニン Y 誘導体を合成し、9 位置換基の電子吸引力を大きくすることで吸収波長が大きくレッドシフトする傾向を見出した。また新たな構造特性として、9 位にアルキル鎖を有するピロニン Y 誘導体に、9 位にベンゼン環を有するピロニン Y では存在しない互変異性体が存在することを明らかにした。得られた知見を利用して、エステラーゼおよびニトリルヒドラーゼを標的とする蛍光プローブを開発することに成功した。