

氏 名	おがわ ふうた 小 川 風 太
学 位 の 種 類	博士（薬学）
学 位 記 番 号	薬博甲 第 3 4 号
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当者
学 位 授 与 の 年 月 日	平成 3 0 年 3 月 2 3 日
学 位 論 文 題 目	TFPE 基を利用した小分子蛍光性有機化合物の合成と酵素活性測定への利用
論 文 審 査 委 員	（主査）表 雅章 （副査）佐久間 信至 （副査）山下 伸二

別紙 1

## 博士論文要旨

論文題目 : TFPE 基を利用した小分子蛍光性有機化合物の合成と  
酵素活性測定への利用

申請者 小川 風太



専攻分野 医薬品開発学

研究指導分野 薬化学

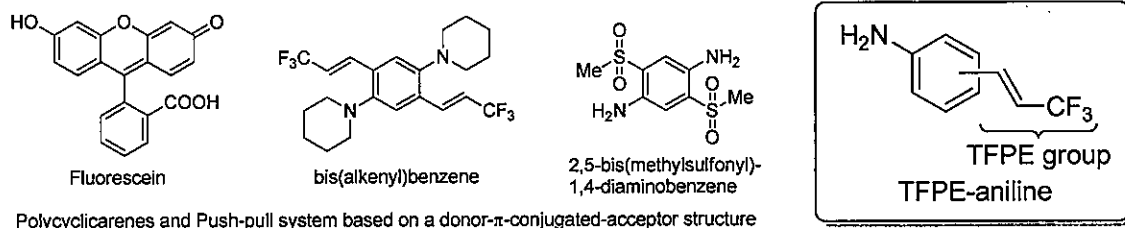
指導教員 表 雅章

本研究は、新しいフッ素官能基として(*E*)-3,3,3-trifluoropropenyl (TFPE) 基を含む小分子蛍光性有機化合物を合成し、それぞれの蛍光特性を見極め、合成した化合物を用いて酵素活性測定を行ったものである。近年、蛍光性有機化合物の重要性は増しており、様々な蛍光性有機化合物が研究対象となってきたものの、小分子蛍光性有機化合物の開発およびその利用に関しては依然として研究の余地がある。そこで、小分子蛍光性有機化合物の開発およびケミカルバイオロジー分野での可能性を見据え、次の項目を研究目的と定めて博士研究を展開した。

- ✓ TFPE 基含有小分子蛍光性有機化合物の合成と物性評価
- ✓ 酵素による加水分解反応を利用した酵素活性測定への利用

#### はじめに

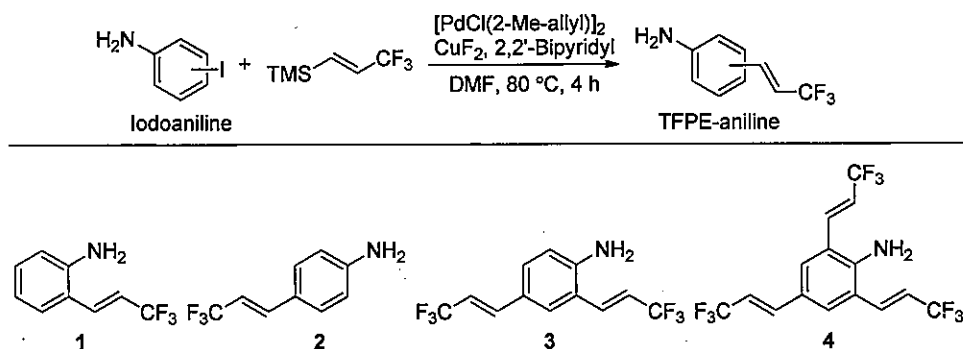
蛍光性有機化合物は、蛍光色素あるいは蛍光プローブ分子の蛍光団として、生化学分野における蛍光バイオイメージングや酵素活性測定など、基礎研究から臨床診断まで幅広く利用されている。その基本骨格の多くは、十分な蛍光強度を得るために拡張  $\pi$  共役系分子のような分子サイズの大きい多環芳香族化合物である。一方で、電子供与性官能基と電子求引性官能基を持ち、分子内で“push-pull system”を形成する化合物では、芳香環を一つしかもたないような小分子でも蛍光性を示すことが報告されている。



蛍光プローブは、分子サイズが大きくなると標的分子のラベル化などの際に、標的分子自身の動きを阻害することが問題になる。そこで、筆者は、単純なアニリンに、電子求引性の (*E*)-3,3,3-trifluoropropenyl (TFPE) 基が置換した “push-pull system” を形成する小分子の TFPE-aniline が、短い共役系にもかかわらず優れた蛍光性ならびに高い化学的安定性を示すことに着目した。加えて TFPE 基は、剛直かつ回転しにくい構造を持つため、励起状態から基底状態へのエネルギー緩和過程において蛍光発光を伴わない無輻射失活によるエネルギー緩和が起こりにくく、さらに、酸素原子や窒素原子のようなルイス塩基性原子を含まないことからプロトン性溶媒が配位せず、プロトン性溶媒の溶媒和による蛍光消光が起こりにくい。つまり、TFPE 基は、水などのプロトン性溶媒中でも蛍光量子収率 ( $\phi$ ) が低下しにくいことが推測される。

#### 小分子蛍光性有機化合物の合成と蛍光特性の評価

目的の TFPE-aniline は、iodoaniline を原料として、 $\text{TMSCH}=\text{CHCF}_3$  を用いる 檜山クロスカップリング反応により合成した。本反応は、遊離の窒素を保護することなく、さらに分子内のヨウ素の数に応じて TFPE 基の導入が行えるものである。

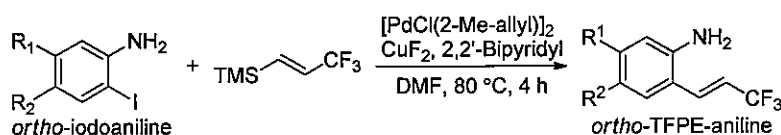


Synthesis of TFPE-anilines by cross-coupling reaction

合成した TFPE-aniline の蛍光波長を測定した結果、TFPE 基の増加に伴い蛍光極大波長は長波長化することが分かった。また、興味深いことに、TFPE 基が 1 つ置換した位置異性体においては、それぞれの蛍光量子収率 ( $\phi$ ) が大きく異なっていた。すなわち、*ortho* に置換した **1** は強い蛍光性を示すのに対し ( $\phi = 0.77$ )、*para* に置換した **2** はほぼ蛍光性を示さなかった ( $\phi = 0.01$ )。両者間での蛍光性の違いを調べるため、**1** および **2** の蛍光寿命 ( $\tau$ ) を測定し、放射失活速度定数および無放射失活速度定数を算出した。結果として **1** は **2** に比べて効率的に蛍光発光を行っていることが分かった。

### 1 の誘導化による蛍光波長の調節

TFPE-aniline の蛍光測定結果から、**1** の 4 位あるいは 5 位に種々官能基を導入することで、蛍光量子収率の向上および異なる蛍光極大波長を持つ化合物の合成を試みた。



Synthesis of *ortho*-TFPE-anilines by cross-coupling reaction

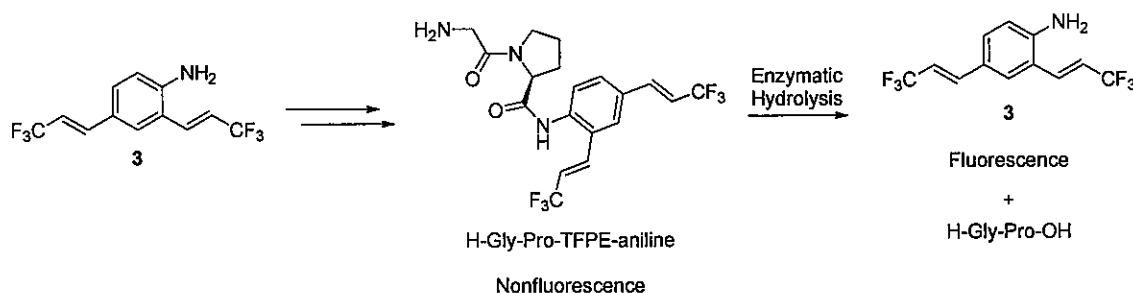
合成した *ortho*-TFPE-aniline の蛍光スペクトルを測定した結果、4 位に電子供与性官能基を持つ場合では、蛍光極大波長の長波長化や蛍光量子収率の増加がみられた。一方、電子求引性官能基を持つ場合では、蛍光極大波長の短波長化や蛍光量子収率の減少がみられた。また、5 位に電子供与性官能基を持つ場合では、蛍光極大波長は短波長化し、蛍光量子収率の減少がみられた。一方、電子求引性官能基を持つ場合では、蛍光極大波長の長波長化や蛍光量子収率の増加がみられた。

特筆すべきことは、*ortho*-TFPE-aniline 類は有機溶媒中だけではなく、水系溶媒中においても蛍光性を示すことである。これは、当初の推測通り、TFPE-aniline 類が、プロトン性溶媒の溶媒和による蛍光消光を避けるという TFPE 基の長所がうまく発揮された結果である。また、すべての TFPE-aniline において、有機溶媒中に比べて蛍光極大波長の長波長化がみられ、一部の TFPE-aniline においては蛍光量子収率の増加もみられた。

### TFPE-aniline を用いた酵素活性測定

TFPE-aniline は水系溶媒中でも十分な蛍光性を示すことから、酵素活性測定など生化学的なアプローチを行う蛍光プローブ分子の蛍光団になると考え、本化合物を利用した酵素活性測定を検討した。

糖尿病の予防や診断面で臨床上の有用性が高いバイオマーカーである Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) を酵素活性測定の標的酵素とし、DPP-4 の基質特異性にあわせてアミノ基をグリシンおよびプロリンで順次ペプチド修飾した化合物 H-Gly-Pro-TFPE-aniline を合成し、酵素活性測定の蛍光基質とした。次に、合成した H-Gly-Pro-TFPE-aniline と TFPE-aniline の蛍光スペクトルを測定したところ、両者の蛍光特性は大きく異なった。すなわち、TFPE-aniline は強い蛍光性を示すが、アミノ基をペプチド修飾した H-Gly-Pro-TFPE-aniline は蛍光性を示さなかった。これにより、H-Gly-Pro-TFPE-aniline はペプチド結合の加水分解反応を起点とする蛍光 OFF/ON スwitchングが可能な蛍光基質となると考えた。実際に、DPP-4 と H-Gly-Pro-TFPE-aniline を水系溶媒中で反応させると、加水分解反応の進行に伴って蛍光性の TFPE-aniline が遊離し、蛍光強度が増加した。つまり、H-Gly-Pro-TFPE-aniline は DPP-4 の蛍光基質となり、本法によって、DPP-4 の酵素活性が正しく測定できた。



Synthesis of OFF-ON-turn probe

### さいごに

近年、蛍光性有機化合物は様々な分野で利用されているが、特に生化学的な分野では、革新的な技術とされるまでに発展している。この目的で利用されている蛍光性有機化合物は優れた蛍光性が必要とされるため、拡張π共役系分子の多環芳香族化合物が主に使われてきた。しかし、その分子サイズの大きさにゆえに標的自身の生理作用を阻害してしまうなど、同時に課題も見受けられる。TFPE-aniline は種々の蛍光性有機化合物と比較しても群を抜いて構造が小さく、単純で、化学的安定性が高いため、使用目的に応じた構造修飾が容易に行える。さらに、水系溶媒においても十分な蛍光性を示すことは特筆すべき利点である。本研究成果を足掛かりに、今後、新たな小分子蛍光性有機化合物の創生、さらに酵素阻害剤など医薬品開発の一助になることを期待したい。