

質問回答（文献セミナー）

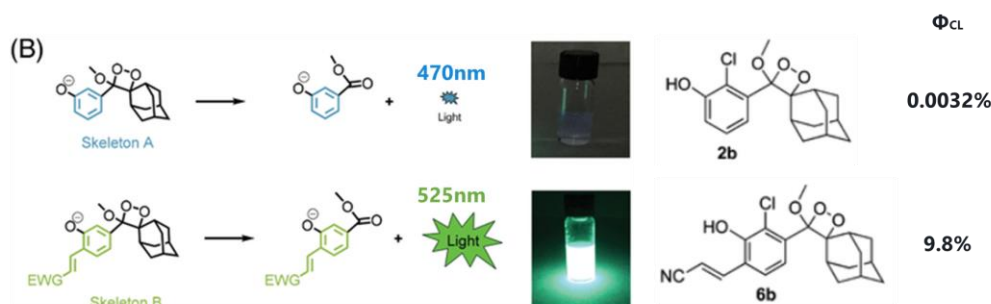
B4 梅田大輝

1. 触媒回転するような化学発光分子の例は存在するか。

Ru(bpy)₃²⁺を用いる電気化学発光では、トリプロピルアミンは使いつぶしになるものの、Ru 錯体は再生されていました。また、オワンクラゲなどの生物発光に利用されるアポタンパク質も再生するようですが、複合体を形成するセレンテラジンは使いつぶしのようなものでした。光などで外部からエネルギーを供給しないのが化学/生物発光なので、どうしても何かしらは使いつぶしになってしまうと思います。[13][14]

2. P.12 のスライド(下図)について、Φ_{CL}(化学発光量子収率)が向上する理由はなぜか。

Shabat's dioxetane



Electron-withdrawing group (EWG) was introduced at the ortho position of the phenol in Schaap's dioxetanes (= skeleton A) → Redshift of wavelength and increase in quantum yield (Φ_{CL})

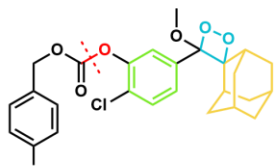
Shabat, D. *et al.* *ACS Cent. Sci.* **2017**, 3(4), 349-358.¹²
Xu, Fu-jian. *et al.* *Aggregate.* **2021**, xx, e140.

ドナー・アクセプター型の蛍光分子では、強力なアクセプター基を使うことで発光波長の長波長化とΦ_F(蛍光量子収率)の向上が見込まれることが(経験側的に?)分かっているらしいです。したがって、EWGの導入によってドナー・アクセプター的な分子構造を作り出すことで、ジオキセタン分解後に生じるエステル(図の矢印右)のΦ_Fが高まり、その結果、Φ_Fに比例するΦ_{CL}も向上したということみたいです。長波長化については、EWGの導入によってLUMOが下がることで説明することができそうですが、Φ_Fの向上についてはよくわかってなさそうでした。ちなみに、Clの置換基は、OHのP_{ka}を上昇させ、CIEEL機構による分子内反応を起しやすくする目的で入れているらしいです。[3][4][5]

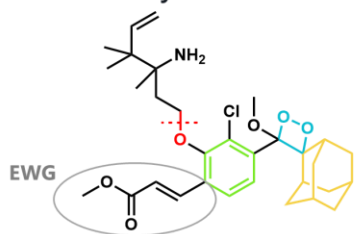
3. P.13のスライド(上図)について、トリガー基を脱保護する際の条件でジオキセタンのO-O骨格が切断されたりしないのか。例えば、H₂Sで2電子的に還元されないのか。

Probe examples

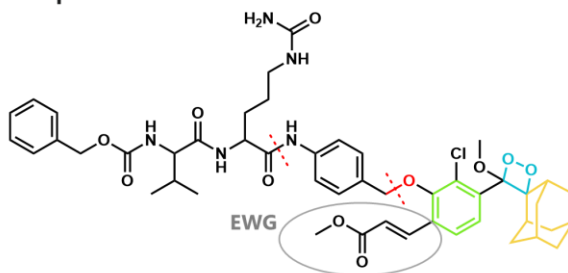
H₂S CL Probe



Formaldehyde CL Probe



Cathepsin B CL Probe



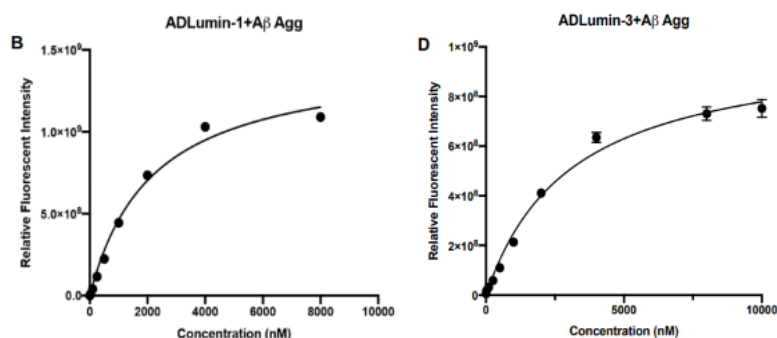
Applicable to *in vivo* imaging

Lippert, A. R. *et al. Chem. Sci.* **2015**, 6, 1979-1985.
 Shabat, D. *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, 56, 15633-15638.
 Shabat, D., Chang, C. J. *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, 57, 7508-7512. 13

特に、ジオキセタン骨格がH₂Sで切断されるなどの記述は見当たりませんでした。これらの化学発光プローブのジオキセタン骨格はアダマンタン(黄色)によって立体的に安定化されており*、また、これらプローブは実際に *in vitro*/*in vivo* で基質選択的なプローブとして働いていることから、ジオキセタン骨格の望まない切断は起こりにくく、また、起こっていたとしても実用に支障のない程度であると思われます。[6][7]
 *詳しくは分かっていないようだが、二面角を大きくして歪みを和らげる効果か。

4. ADLumin-1が酸素と反応した後の生成物(ADLumin-3)の結合定数は？

値は特に書いてなかったのですが、ADLumin-1の結合定数を調べたときにつかったグラフのADLumin-3バージョンがありました(下図)。これを見る限りだと、ADLumin-1の2.1μMと同じくらいでしょうか…？[1]

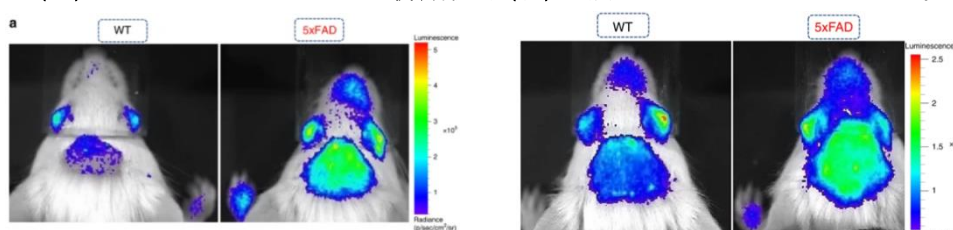


5. ADLumin-1 は従来の近赤外蛍光プローブと比較してどれくらいの投与量が必要なのか。

ADLumin-1 の投与量は 4mg/kg で、DAS-CRET を行う場合は、さらに 4mg/kg の CRANAD-3 を添加していました。一方、筆者らの過去の研究である CRANAD-3 による蛍光イメージングでは、0.5mg/kg の投与量となっていました。やはり、化学発光イメージングは、蛍光イメージングよりも投与量が多くなってしまいます。

[1][2]

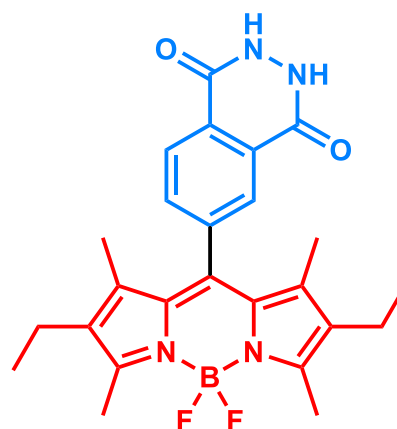
6. P.16 と P.20 のスライドの図(下図)について、WT での発光が ADLumin-1 単体のとき(左)よりも CRANAD-3 との併剤投与(右)で強くなっているのはなぜか。



どちらの画像も open filter 設定で撮ったものとのことで、特定の波長を設定せず光を検出しています。したがって、DAS-CRET での実験では、ADLumin-1 だけでなく、CRANAD-3 の非特異的な蛍光も拾う分、バックグラウンドが高くなってしまったものと思われます。 [1]

7. 下図のような化合物が、重原子効果なしに一重項励起状態から三重項励起状態へ移動できるのはなぜか。

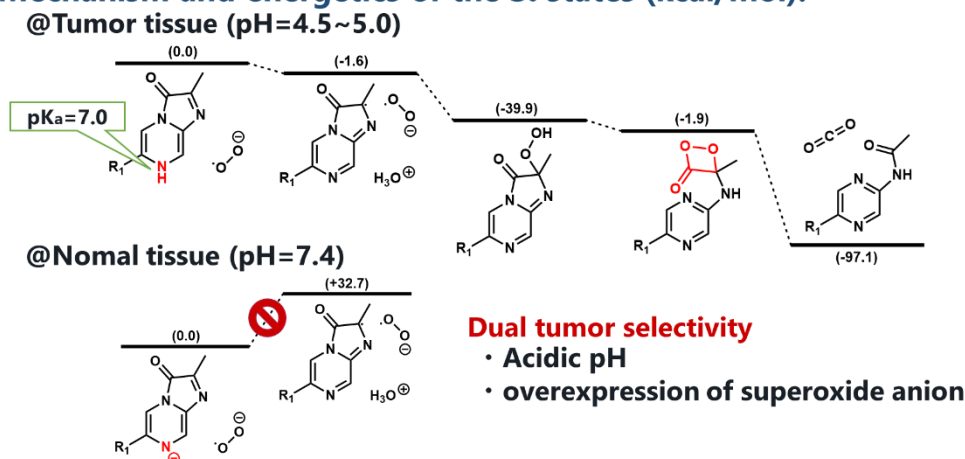
特に理由の記述はありませんでした。狙ってつくった訳ではなく、偶然の産物であるようです。なお、赤色の BODIPY コアからなる分子(BODIPY-CH₂Cl)に 30 分の光照射をしても、¹O₂ の生成は確かめられなかったことから、一重項励起状態から三重項励起状態への項間交差は、赤色部分が青色部分と結合することによって促進されるものと推定されています。したがって、青色のルミノール骨格は CRET のきっかけとなる一重項励起状態を齎すだけでなく、項間交差を起こしやすくする働きもあるのかもしれません。 [10]



8. P.28 のスライド(下図)について、pH7.4 における反応が吸熱反応になるのはなぜか。

Reaction

Mechanism and energetics of the S_0 states (kcal/mol):



da Silva, L. P. et al. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, 183, 111683. 28

特に本文中に記述はありませんでした。ともすると、pH7.4 での反応は、負電荷を帯びた分子同士が接近しなくてはならないため、エネルギー的に不利なのかもしれません。[8]

9. P.28 のスライド(上図)について、がん組織での pH はこんなに低いものか。

pH4.5~5.0 というのはリソソームの液性を表しているようです。転移性大腸がんなどの悪性化したヒトがん組織では、リソソームが細胞膜と融合して内容物を細胞外へと放出することがあるようで、このことをもとに、がん微小環境の pH が 4.5~5.0 と言っているのかもしれませんが。しかしながら、実際の pH はそこまで下がらず、生体内の基本的な環境である pH7.4 から 6.5 程度へシフトするらしいです。なお、このような場合であっても、環境の pH は化合物の pKa(7.0) よりも小さくなるため、pH によるがん組織選択性という主張は覆らないと思われます。[8][9]

10. Imaging と PDT では、骨格が同じなのに酸化機構が異なるのはなぜか。

Imaging で紹介した ADLumin-1 も、CL 開始型 PDT で紹介した Br-Cla も、セレンテラジンとよばれる化学発光体に含まれるイミダゾピラジノン骨格を有しているにも拘わらず、前者では自動酸化($3O_2$)で、後者ではスーパーオキシドアニオン(O_2^-)で酸化反応が起こると説明されていました。ここでは、これらの酸化機構の違いについて考えます。まず、セレンテラジンの化学発光が、溶媒に 20%程度の水が含まれるだけで消光するという報告があったため、生体内で、ADLumin-1 が自動酸化されるとい

う機構に疑問が抱かれました。セレンテラジンの $3O_2$ との化学発光反応は、SET によるセレンテラジンラジカルと O_2 -の生成と、これらの再結合によるジオキセタノンの生成を経ると考えられていますが、上述した消光現象を調べた論文では、極性溶媒中で O_2 -の寿命が短くなるのが消光の原因であると主張しています。このことと、ADLumin-1 が凝集 $A\beta$ 中の疎水的環境に結合するという分子ドッキングの結果をあわせて考えると、結合部位の低極性環境がスーパーオキシドアニオンの寿命を延ばし、自動酸化による化学発光反応を可能にしている、という説明ができるかもしれません。この場合、ADLumin-1 は、生体内のいたるところで自動酸化されるのではなく、 $A\beta$ と結合したときなどの限られた条件で酸化が進行すると考えられるため、ある程度の選択性が生じている可能性があります。なお、Br-Cla についても、 O_2 -が極性環境中で低寿命であることを考慮すると、セレンテラジンとの反応はがん組織の極近傍でしか起こらないことが想定されるため、副作用の小ささが期待できます。以上をまとめると、セレンテラジンの酸化機構の違いについては次のように説明できる可能性があります。

- ・セレンテラジンは ROS と反応して化学発光可能だが、非極性環境では自動酸化による化学発光経路も存在する。
- ・ADLumin-1 では、ROS が存在しないため*ROS との反応は起こらないが、 $A\beta$ 結合時に非極性環境となるため、自動酸化によって化学発光が生じる。
- ・Br-Cla では、非極性環境にないため自動酸化はおこらないが、がん微小環境に存在する寿命の短いスーパーオキシドアニオンと反応して化学発光が生じる。

[1][8][11][12]

*AD 患者脳には ROS が存在すると言われているので、もしかすると生体内での ADLumin-1 の化学発光は、自動酸化機構以外の機構が関わっている可能性もあるかもしれません。論文の中では、ROS と反応させても $3O_2$ でバブリングさせたときほど化学発光は見られなかったと述べていましたが、 H_2O_2 や O_2 -との反応では、コントロールと有意差がありそうな結果だったため、ROS との反応は起こりうるものと予想されます。

【参考文献】

1. Jing Yang, Wei Yin, Richard Van, Keyi Yin, Peng Wang, Chao Zheng, Biyue Zhu, Kathleen Ran, Can Zhang, Mohanraja Kumar, Yihan Shao & Chongzhao Ran. Turn-on chemiluminescence probes and dual-amplification of signal for detection of amyloid beta species in vivo. *Nature Communications*. 2020, 11, 4052.
<https://www.nature.com/articles/s41467-020-17783-4#Sec21>
2. Xueli Zhang, Yanli Tian, Can Zhang, Xiaoyu Tian, Alana W. Ross, Robert D. Moir, Hongbin Sun, Rudolph E. Tanzi, Anna Moore, and Chongzhao Ran. Near-infrared fluorescence molecular imaging of amyloid beta species and monitoring therapy in animal models of Alzheimer's disease. *PNAS*. 2015, 112(31), 9734-9739.

- <https://www.pnas.org/content/112/31/9734>
3. Ori Green, Tal Eilon, Nir Hananya, Sara Gutkin, Christoph R. Bauer, and Doron Shabat. Opening a Gateway for Chemiluminescence Cell Imaging: Distinctive Methodology for Design of Bright Chemiluminescent Dioxetane Probes. *ACS Cent. Sci.* **2017**, 3, 4, 349–358.
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscentsci.7b00058>
 4. Naama Karton-Lifshin, Lorenzo Albertazzi, Michael Bendikov, Phil S. Baran, and Doron Shabat. “Donor–Two-Acceptor” Dye Design: A Distinct Gateway to NIR Fluorescence. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 50, 20412–20420.
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja308124q>
 5. Zhijia Wang, Jianguo Huang, Jingsheng Huang, Bingran Yu, Kanyi Pu, Fu-Jian Xu. Chemiluminescence: From mechanism to applications in biological imaging and therapy. *Aggregate.* **2021**, e140.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/agt2.140>
 6. J. Cao, R. Lopez, J. M. Thacker, J. Y. Moon, C. Jiang, S. N. S. Morris, J. H. Bauer, P. Tao, R. P. Mason and A. R. Lippert. Chemiluminescent probes for imaging H₂S in living animals. *Chemical Science.* **2015**, 6, 1979-1985.
<https://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2015/sc/c4sc03516j>
 7. 松本正勝. CIEEL 型高効率化学発光基質の設計と合成. 有機合成化学協会誌. **2003**, 61(6), 595-604.
https://www.jstage.jst.go.jp/article/yukigoseikyokaishi1943/61/6/61_6_595/_pdf
 8. Luís Pinto da Silva, Ara Núñez-Montenegro, Carla M. Magalhães, Paulo J. O. Ferreira, Diana Duarte, Patricia González-Berdullas, José E. Rodríguez-Borges, Nuno Vale, Joaquim C. G. Esteves da Silva. Single-molecule chemiluminescent photosensitizer for a self-activating and tumor-selective photodynamic therapy of cancer. *European Journal of Medicinal Chemistry.* **2019**. 183, 111683.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523419308335?via%3Dihub#bib48>
 9. Yosuke Funato, Atsushi Yoshida, Yusuke Hirata, Osamu Hashizume, Daisuke Yamazaki, Hiroaki Miki. The Oncogenic PRL Protein Causes Acid Addiction of Cells by Stimulating Lysosomal Exocytosis. *Developmental Cell.* **2020**, 55(4), 387-397.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1534580720306675?via%3Dihub>
 10. Aysun Degirmenci, Ömer Sonkaya, Caner Soyulkan, Tuğçe Karaduman, and Fatih Algi. BODIPY and 2,3-Dihydrophthalazine-1,4-Dione Conjugates As Heavy Atom-Free Chemiluminogenic Photosensitizers. *ACS Appl. Bio Mater.* **2021**. 4, 6, 5090-5098.
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsabm.1c00328>

11. João M. Lourenço, Joaquim C. G. Esteves da Silva, Luís Pinto da Silva. Combined experimental and theoretical study of Coelenterazine chemiluminescence in aqueous solution. *Journal of Luminescence*. **2018**, 194, 139-145.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022231317311961>
12. C. Cheignon, M. Tomas, D. Bonnefont-Rousselot, P. Faller, C. Hureau, F. Collin. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biology*. **2018**, 14, 450-464.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213231717307267?via%3Dihub>
13. 近江谷克裕. 解説 発光クラゲの生物発光機構を探る カルシウム結合型発光蛋白質の生物発光メカニズム. *化学と生物*. **1997**, 35(6), 422-428.
https://www.jstage.jst.go.jp/article/kagakutoseibutsu1962/35/6/35_6_422/_pdf/-char/ja
14. 金継業. 電気化学発光に基づく分析・検出方法. *Review of Polarography*. 2014, 60(2), 111-120.
https://www.jstage.jst.go.jp/article/revpolarography/60/2/60_111/_pdf/-char/ja