九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

Xanthene誘導体を用いた新規蛍光レシオプローブの開発と細胞イメージングへの応用

髙嶋, 一平

https://hdl.handle.net/2324/1500650

出版情報：九州大学, 2014, 博士（薬学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

Xanthene 誘導体を用いた新規蛍光レシオプローブの開発と細胞イメージングへの応用

生体分析化学分野　3PS11013P　髙嶋　一平

【序論】

細胞内で生じる化学的イベントは細胞内の様々な分子 (DNA, RNA, タンパク質, 情報伝達分子, 金属イオンなど) が時空間的にダイナミックな濃度変動を生じることで成立している。筆者らは、この細胞内での分子挙動を簡便に蛍光解析可能な分子ツール(蛍光プローブ)の開発を実施してきた。特に本研究では 9 位無置換の xanthene (H9-xanthene) に着目している。Xanthene は fluorescein の基本骨格であり非常に明るい蛍光性や高い親水性を有する生化学実験に適した蛍光色素であるが、未だに蛍光プローブへの応用例はほとんどなく、当研究室が独占的に研究しているのが現状である。本研究では、xanthene の 1,8 位に官能基を導入することで様々なセンシング機構を有する蛍光レシオ型プローブを開発した。

これまでに多くの蛍光プローブが開発されてきたが、そのセンシング機構は光誘起電子移動(PeT)など特定の機構が多用され、とりわけ蛍光レシオ型プローブの開発は限定的である。蛍光プローブは蛍光 OFF-ON 型と蛍光レシオ型に大別され、前者は定量性に欠ける問題点を有する。蛍光 OFF-ON 型はターゲットの認識に伴う 1 波長の蛍光強度変化を検出するが、蛍光強度はプローブ自体の濃度変動などの他因子によってシグナル変化してしまうためである。しかし、後者は 2 波長の蛍光強度変化（蛍光色の変化）を検出するため、このような他因子の影響は少なく(プローブの濃度変化では蛍光は色変化しないため)、より定量性の高い解析が可能である。本研究では従来とは異なる蛍光センシング機構を有する蛍光レシオ型プローブを開発するとともに、これらセンシング機構を詳細に検討した。さらに本機構を用いて細胞イメージング研究へと応用し、これらセンシング機構の汎用性や有用性を示すことを目指した。

【実験と考察】

1．AM contact 機構における検討[i]

以前に筆者は右図の二核亜鉛錯体分子 **2a**-2Zn^{II} がポリリン酸種を選択的に蛍光 OFF-ON で検出可能であることを見出した[ii]。本錯体は二核の亜鉛イオンに架橋配位した水分子が xanthene 9 位に求核攻撃することで蛍光 OFF 状態にあるが、ポリリン酸種の配位に伴って架橋配位した水分子を失って蛍光 ON 状態となる(図 1a, b)。さらに **2a**-2Zn^{II} を生化学実験へと応用し、Jurkat 細胞内の ATP 顆粒 (ATP 蓄積した分泌顆粒組織)を選択的に蛍光イメージングすることに世界ではじめて成功した。

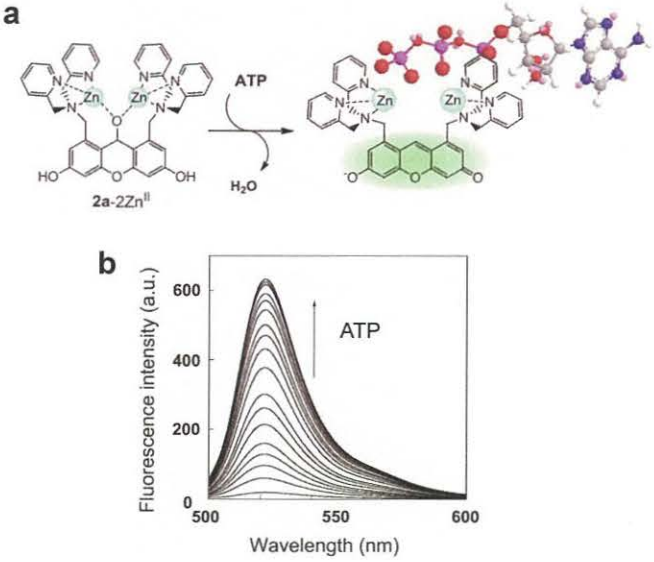

図 1 (a) **2a**-2Zn^{II} 錯体と ATP の反応式、(b) **2a**-2Zn^{II} 錯体水溶液の ATP 滴定時の蛍光スペクトル変化。

ところで 1990 年に Czarnick らは anthracene 9 位に 1,4,7,10,13-pentaazacyclopentadecane を導入した化合物が Cd^{II} の配位に伴って著しい蛍光レッドシフトを示すことを報告した[iii]。本研究は後続の蛍光プローブ開発もなく、そのセンシング機構は未解明のままであった。そこで筆者は本研究に合わせて化合物 **2a** の Cd^{II} に対する蛍光応答を評価した結果、Czarnick らの報告同様に化合物 **2a** が Cd^{II} の配位に伴って著しい蛍光レッドシフトを示すことを確認した(図 2)。さらに他の金属種に対する化合物 **2a** の蛍光応答も評価した結果、化合物 **2a** が Cd^{II} や Ag^{I} など Van der Waals 半径の大きい金属種で特異的に蛍光レッドシフトを示すことを見出した。

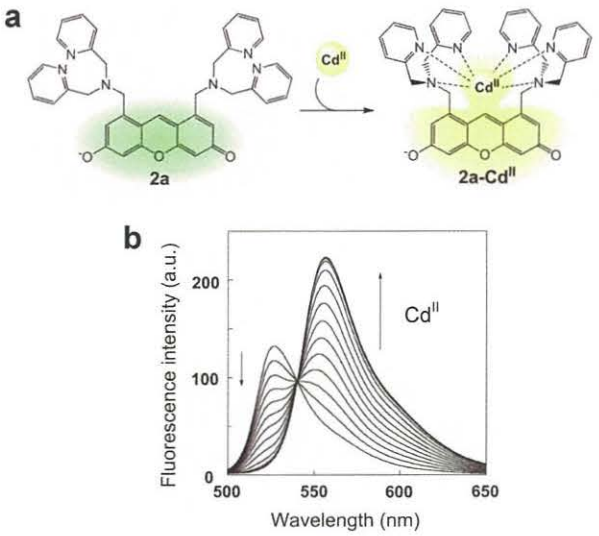

図 2 (a) 化合物 **2a** と Cd^{II} の反応式、(b) 化合物 **2a** 水溶液の Cd^{II} 滴定時の蛍光スペクトル変化。

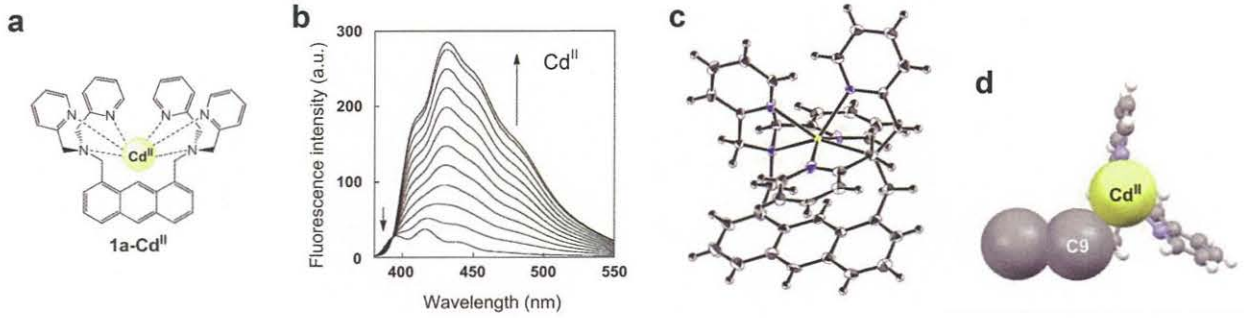

図 3 (a) **1a**-Cd^{II} 錯体分子の構造、(b) 化合物 **1a** 水溶液への Cd^{II} 滴定時の蛍光スペクトル変化、(c) **1a**-Cd^{II} 錯体の X 線結晶構造解析 ORTEP 図 (50% probability ellipsoids)、(d) **1a**-Cd^{II} 錯体解析結果(c)の Spacefill モデル断面図

筆者らは、本機構について詳細に検討するため anthracene 型分子 **1a** を新たに合成した。本分子もまた Cd^{II} の配位に伴って蛍光レッドシフトする(図 3b)。Job's plot から **1a** は Cd^{II} と化学量論比 1:1 で配位し、Cd^{II} を二つのリガンドで挟み込むように配位すると示唆された。次に **1a**-Cd^{II} 錯体の X 線結晶構造解析を実施した結果、anthracene の 9 位の炭素と Cd^{II} 間で Van der Waals 半径内で接触した構造を示し、この芳香族色素-金属イオン間での接触構造を Arene-Metal ion contact(AM-contact)構造と命名した(図 3c,3d)。合わせて AM-contact 構造と蛍光レッドシフト現象の関係性を検討するため、分子軌道計算を実施した結果、LUMO で金属イオンが芳香族色素(anthracene/xanthene)の 9 位に位置する分子軌道と静電的に相互作用するが、HOMO では色素の 9 位で分子軌道の node に位置し、そのような静電的相互作用を有さない。よって、LUMO が HOMO に比べてよりエネルギーが安定化するため蛍光レッドシフトすることを理論的に説明した。

本蛍光プローブ **2a** は従来の蛍光プローブに比べて高感度(検出感度 13.6 nM)かつ高選択的に Cd^{II} を検出可能であり、anthracene に比べて長波長励起で細胞へのダメージも少ない特徴を有する。そこで本蛍光プローブ **2a** を細胞内へ導入した結果、Cd^{II} の細胞内移行を subcellular レベルで可視化解析することに成功した。このように Cd^{II} の細胞内移行を詳細に蛍光イメージングした前例はなく、本手法が Cd^{II} の生体内挙動解析において有用

な手法であることを示す結果である。

ところで本機構を多様な金属種へと展開するためには、従来の二つのリガンドを有する蛍光プローブ構造(Type I)では金属種によって蛍光プローブと 1:2 で金属配位し、AM-contact 構造を示さない問題点を有する。そこで筆者は超分子化学における cryptand や lariat ether の分子構造を模倣した環状型蛍光プローブ(Type II)を新たに分子設計した。Type II は Type I と異なり金属配位数を 1:1 に固定可能であり、架橋した剛直なリガンド構造を有することで金属イオンを芳香族色素へ近接しやすいことが期待される。合成した化合物群の中で化合物 **17** は Ag^{I} に対して非常に高い選択性で蛍光レッドシフトを生じることを見出した(図 4b,4c)。本化合物に関しても Type I と同様に X 線結晶構造解析や分子軌道計算によりメカニズム解明を行ったので合わせて報告する予定である。

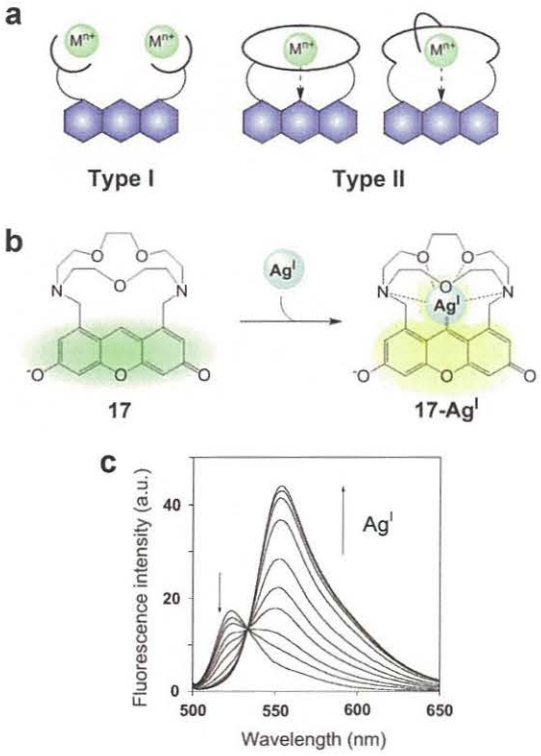

図 4 (a) Type I と Type II の分子構造、(b) 化合物 **17** と Ag^{I} との反応式、(c) 化合物 **17** 水溶液の Ag^{I} 滴定時の蛍光スペクトル変化。

2．Xanthene の触媒的酸化反応を応用した蛍光プローブ[iv]

以前に筆者は化合物 **2a** が TLC 上で空気酸化を受けて緑色蛍光から青色蛍光へ変化することを見出したが、非常に反応速度が遅く蛍光プローブとして応用することは困難であった。そこで筆者は、触媒能を有する官能基を xanthene の 1,8 位に導入することで反応加速し、活性酸素種(ROS)を検出可能な蛍光プローブへと展開することを目指した。Xanthene の 1,8 位に様々な官能基を導入した化合物を合成したが、多くは金属イオンに結合可能で金属イオンリッチな生理条件下では蛍光応答してしまうことが懸念される。しかし、その中で化合物 **31** は金属配位能が低く、さらに迅速に酸化されて xanthone 様の青色蛍光を示すことを見出した。

そこで筆者は水溶液中で本化合物 **31** の ROS に対する蛍光応答を評価した結果、過酸化水素(H_2O_2)に対して選択的に反応し、520 nm の蛍光減少と 450 nm の蛍光上昇を確認した(図 5b)。さらに本反応は、弱酸性環境下(pH

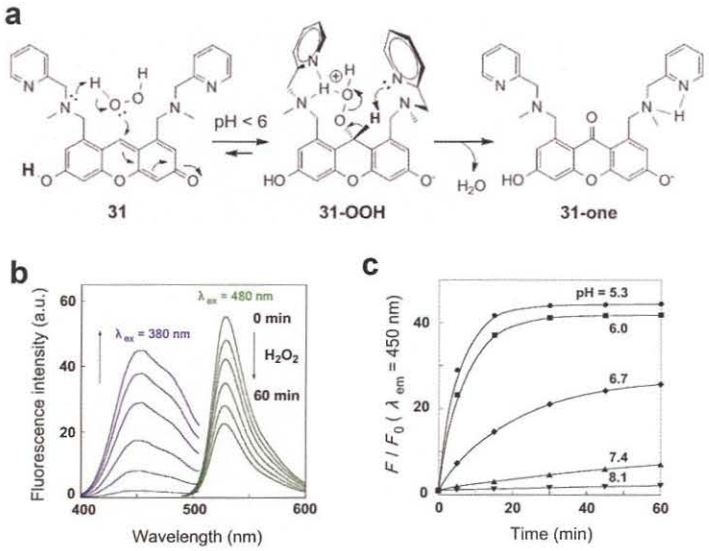

図 5 (a) 化合物 **31** と H_2O_2 との反応メカニズム、(b) 化合物 **31** 水溶液に H_2O_2 添加後の蛍光スペクトル経時変化、(c) 化合物 **31** 水溶液の H_2O_2 添加後の xanthone **31-one** 体の蛍光強度の経時変化 (λ_{ex} = 380 nm ,0-60 min)。

5-6)で著しく反応加速し、H_2O_2と弱酸性に応答するANDロジックゲートであると判明した(図5c)。

筆者は本反応のメカニズム解明を目的として、HPLC/MSによる反応追跡や誘導体合成を実施した。結果として、本反応はxanthene 9位にH_2O_2が求核攻撃して共有結合を形成した中間体31-OOHを生成する第1ステップと、この中間体からxanthone構造(31-one)へ酸化的に変換される第2ステップが存在すると示した(図5a)。また誘導体との比較評価結果から、xanthene 1,8位に導入したピリジン部位と3級アミン部位が酸塩基触媒的に作用することで色素構造の変換反応を著しく加速していることが示唆された。

さらに本分子31のANDロジックゲートを応用し、マイトファジーにおけるオートリソソーム形成を蛍光レシオ検出することに成功した。マイトファジーとは損傷ミトコンドリアを選択的に除去するオートファジーであり、膜電位喪失に伴ってH_2O_2が蓄積したミトコンドリアがオートリソソーム内にリクルートされる。よって、オートリソソーム内のH_2O_2の蓄積と弱酸性の2シグナルを認識して化合物31はオートリソソーム内で選択的にxanthoneへ変換される。本研究にて世界に先駆けて人工小分子によるマイトファジー検出法を開発し、従来法に比べてより簡便なマイトファジー検出が可能となると期待される。

【結言】

本研究によりxantheneの潜在的な有用性を新たに示したと考える。例えば、筆者はxantheneの9位炭素が高い求電子性を有することに着目し、これを活かしてポリリン酸種選択的な蛍光OFF-ONセンシング機構やH_2O_2によるxantheneの酸化的変換反応を用いた蛍光レシオセンシング機構を新たに見出した。

一方、本研究で示したセンシング機構は蛍光プローブの分子設計における汎用性が高いと考える。特にAM-contact機構は多様な金属種へと展開可能であると考えており、実際にFe^{III}, Al^{III}, Zn^{II}, Sr^{II}, La^{III}など多様な金属種でAM-contact機構による蛍光レッドシフト現象が生じることを確認している。

序論に記載するように従来は蛍光レシオ型プローブの開発は限定されてきたが、本研究では異なるセンシング機構による新規分子設計により、従来と異なる特性を持つ蛍光レシオ型プローブを開発可能であると示した。今後の蛍光プローブの開発において本研究が幅広く応用されるためにさらに研究展開していく。

【引用文献】

[i] (a) Design of Ratiometric Fluorescent Probes Based on Arene–Metal-Ion Interactions and Their Application to Cd^{II} and Hydrogen Sulfide Imaging in Living Cells. I. Takashima, M. Kinoshita, R. Kawagoe, S. Nakagawa, M. Sugimoto, I. Hamachi, A. Ojida, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, p2184 – 2192. (b) Aza-Crown-Ether-Appended Xanthene: Selective Ratiometric Fluorescent Probe for Silver(I) Ion Based on Arene–Metal Ion Interaction. I. Takashima, A. Kanegae, M. Sugimoto, and A. Ojida *Inorg. Chem.* **2014**, *53*, p7080–7082.

[ii] Turn-On Fluorescence Sensing of Nucleoside Polyphosphates Using a Xanthene-Based Zn(II) Complex Chemosensor. A. Ojida, I. Takashima, T. Kohira, H. Nonaka, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, p12095–12101.

[iii] Chelatoselective Fluorescence Perturbation in Anthrylazamacrocycle Conjugate Probes. Electrophilic Aromatic Cadmiation. M. E. Huston, C. Engleman, A. W. Czarnick, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, p7054–7056.

[iv] Development of an AND Logic-Gate-Type Fluorescent Probe for Ratiometric Imaging of Autolysosome in Cell Autophagy. I. Takashima, R. Kawagoe, I. Hamachi, and A. Ojida, *Chem. Eur. J.* **2015**, ASAP.