

# 論文の内容の要旨

論文題目 生体分子をターゲットとした新規機能性  
蛍光プローブの開発

氏名 正田 卓司

## 【序論】

生体分子の機能解明を行うには、分子自身の挙動を直接観察することが有効である。そこで細胞や組織が生きたままの状態で見えることを目標とするバイオイメージング技術が大きな注目を集めている。中でも蛍光法は、目的物質を捕捉することでその蛍光特性が変化する機能性分子を用いる手法であり、このような機能性分子は蛍光プローブと呼ばれ、近年盛んに研究が行われている。

本研究では生体への応用を目指した蛍光プローブを創製するための分子設計を行った。具体的な本研究のターゲットとして、細胞内に豊富に存在する  $Mg^{2+}$ 、これまでに有用な蛍光プローブが存在しない  $Cu^{+}$ 、およびタンパク質を特異的にラベル化可能な機能性ラベル化試薬の開発を試みた。蛍光団にはクマリン、フルオレセインおよびローダミンを用いることとした。これらは水系溶媒中にて蛍光量子収率 ( $\Phi$ ) が高く、生物応用に適した蛍光色素であり、これら蛍光団に機能を付加していくことにより生物応用が可能な蛍光プローブになると考えた。

## 【本論】

### 1. $Mg^{2+}$ 蛍光プローブのデザイン・合成

細胞内で  $Mg^{2+}$  は高濃度 (約  $10^{-3}$  M) に存在し、その機能は蛋白質、核酸、膜等の構造安定化、酵素活性の補助、ATP との結合、イオンチャネルの制御等多岐にわたる。しかし遊離の  $Mg^{2+}$

( $10^{-4}$  –  $10^{-3}$  M) の詳細な動態については不明な点が多い。これまでの  $Mg^{2+}$  イメージングは APTRA (*o*-aminophenol-*N,N,O*-triacetic acid) をキレーター構造に持つ magfura-2 等を用いて行われてきたが、キレーター構造に由来する性質のため  $Ca^{2+}$  に対する親和性が高く、 $Mg^{2+}$  のイメージングには適切ではない。選択的かつ実用的な  $Mg^{2+}$  蛍光プローブは存在しないのが現状である。

本研究では細胞内の  $Ca^{2+}$  濃度 ( $10^{-9}$  –  $10^{-4}$  M) が  $Mg^{2+}$  の濃度に比べて非常に低いという点に着目し、キレーター構造として  $\beta$ -ケト酸構造を選択した。 $\beta$ -ケト酸構造は  $Mg^{2+}$  および  $Ca^{2+}$  に対して同等の親和性を示すことが知られており、このキレーターを蛍光プローブに応用することで、細胞内における  $Mg^{2+}$  濃度を検出する際に  $Ca^{2+}$  濃度変動の影響を受けないことを期待した。そこでまず 7-hydroxycoumarin-3-carboxylic acid (HCCA) を用いてその蛍光特性を検討したところ  $Mg^{2+}$  の添加により、極大吸収のレッドシフト (344 nm  $\rightarrow$  400 nm) および 388 nm 励起時における蛍光強度が約 2 倍に増加した。また蛍光強度の変化から  $K_d$  は 27 mM と算出された。 $Ca^{2+}$  を添加したところ同様のスペクトル変化が観察され、 $K_d$  は 41 mM と算出された。以上のことから  $\beta$ -ケト酸構造を有する蛍光色素は  $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$  を添加することで光学特性が変化し、また、 $Mg^{2+}$  に対して  $Ca^{2+}$  よりも高い親和性を有することが示唆された。

次に長波長励起が可能なフルオレセインを蛍光団とした  $Mg^{2+}$  蛍光プローブの開発に着手した。フルオレセインのカルボニル基に着目し、その *o*-位にカルボキシル基が導入された、 $\beta$ -ケト酸構造を有する 2'-CF (Fig. 2) をデザイン・合成した。2'-CF に pH 7.4 の中性条件下において  $Mg^{2+}$  を添加した場合吸収・蛍光スペクトルの変

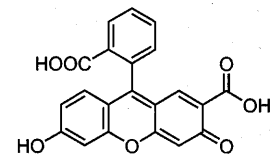


Figure 2 2'-CF の構造

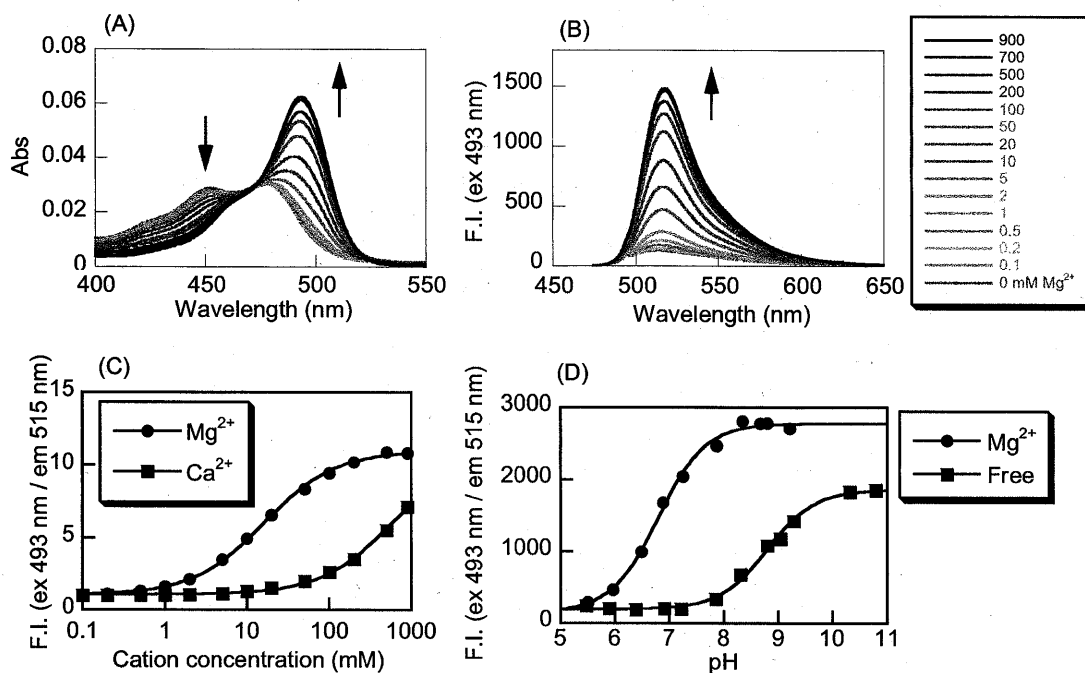


Figure 1  $Mg^{2+}$  添加 2'-CF の光学特性の変化。1  $\mu$ M 2'-CF, 50 mM HEPES pH 7.4 にて測定。(A) 吸収スペクトル, (B) 蛍光スペクトル。(C)  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  に対する選択性 (D)  $Mg^{2+}$  添加による pH プロファイルの変化

化を Fig. 1 (A, B) に示す。吸収スペクトルにおいては 453 nm の淡色効果, 493 nm の濃色効果, 極大吸収のレッドシフト (477 nm → 493 nm) が, 蛍光スペクトルにおいては 493 nm 励起時における 515 nm の蛍光強度が 11 倍に増加した。また, 蛍光量子収率  $\Phi$  は 0.41 から 0.75 に増加していた。以上のことから, 2'-CF の  $Mg^{2+}$  添加による蛍光強度の増加は励起波長である 493 nm の  $\epsilon$  の増加と蛍光量子収率の増加の 2 成分の寄与によるものと考えられる。この蛍光強度変化から  $K_d$  は 15.8 mM と算出され, また  $Ca^{2+}$  に比べて 10 倍以上親和性が高いことが示された (Fig. 1 (C)). 吸収スペクトルの変化が pH 依存的な変化と類似していることから,  $Mg^{2+}$  添加, 非添加時における pH 依存性を検討したところ, 蛍光団の phenol 性 OH 基の  $pK_a$  がシフト (8.8 → 6.8) することが示された (Fig. 1 (D)). 細胞内における  $Ca^{2+}$  濃度は  $10^{-8} - 10^{-6}$  M であることから, 2'-CF は細胞内における  $Mg^{2+}$  濃度を選択的に検出することが可能である。

以上の結果から pH 7.4 の水溶液中において 2'-CF は Fig. 3 に示した構造をとり,  $Mg^{2+}$  に配位することで  $O^-$  form となり, 蛍光強度が増加するというメカニズムが示された。

同様の原理を他の蛍光団にも応用するため, ローダミン誘導体をデザイン・合成した。この結果, 2'-CF と同様のスペクトル変化, および  $K_d$  を示し, さらに長波長励起が可能な  $Mg^{2+}$  蛍光プローブの開発に成功した。

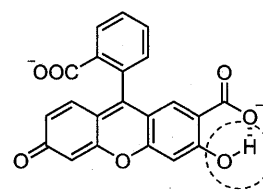


Figure 3 pH 7.4 における 2'-CF の構造

## 2. 蛍光強度増加型銅イオン蛍光プローブのデザイン・合成

重金属イオンを検出する蛍光プローブは, ほとんどが金属添加によって消光 (蛍光の消失) する性質を持つ。この消光機構の原因はエネルギー移動, 電子移動, スピン-軌道相互作用などが挙げられているが, 実際にはこれら全てが同時に起こっていると考えられ, 複雑なメカニズムが予想される。近年, 光誘起電子移動 (Photoinduced electron Transfer, PeT) を発蛍光原理とした  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  の蛍光プローブが開発されている。これらは  $Zn^{2+}$  や  $Cd^{2+}$  を添加すると蛍光強度が増加するが, 他の金属では消光することが知られている。 $Zn^{2+}$  や  $Cd^{2+}$  は最外殻  $d$  軌道が閉殻であるため上述の金属に由来する消光原因の寄与は小さいと考えられる。本研究では  $Cu^+$  も同じく最外殻  $d$  軌道が閉殻であることに着目し,  $Cu^+$  に対する PeT を発蛍光原理とした蛍光プローブ TXs のデザイン・合成を行った (Fig. 4 (A)).

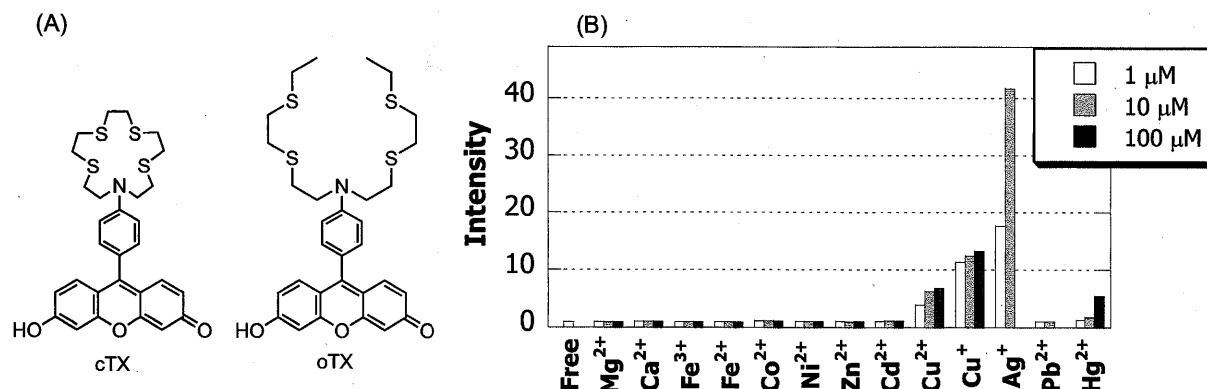


Figure 4 (A) TX の構造 (B) cTX の選択性.

TXs のデザインには蛍光団にフルオレセイン, 金属配位部位には  $\text{Cu}^+$  を安定かつ選択的に保持するために Soft な配位子である硫黄 S を有し, 金属に配位することで蛍光団に直結しているアニリン部位の電子密度が低下し, 蛍光強度が変化することを期待した. 合成した TXs に, 50% MeOH/HEPES buffer 中 (pH 7.4) において  $\text{Cu}^+$  を添加したところ cTX で約 13 倍, oTX で約 19 倍に蛍光強度が増加し,  $K_d$  は  $1 \mu\text{M}$  以下であり,  $600 \text{ nM}$  以下において直線的に蛍光強度が増加することを確認した. また *d* 殻の構造が  $\text{Cu}^+$  と同様に閉殻である  $\text{Ag}^+$  を添加したところ, cTX で 42 倍, oTX で 11 倍の蛍光強度の増加が観察された. 続いて選択性を検討したところ, 両者とも第 11 族金属イオン添加時においてのみ蛍光強度が増加し (Fig. 4 (B)), 高い選択性を有していることが示された. これらのことから TXs は水系溶媒中で機能し, さらに可視光による励起が可能な蛍光強度増加型銅イオン蛍光プローブであることが示された.

### 3. タンパク質を高感度かつ特異的にラベル化可能な機能性ラベル化試薬の開発

細胞や組織が生きたままの状態でタンパク質の細胞内局在や動的挙動を直接的に可視化することは, タンパク質の生理機能を解明する上で極めて重要である. そのため従来では GFP との融合タンパク質を用いる手法がとられてきたが, GFP 自身のサイズや蛍光団形成のタイムラグが問題であり, 目的タンパク質の挙動を正確に追跡できない可能性を考慮しなくてはならない. そこで私はタグとなる小分子ペプチドと反応する蛍光小分子を組み合わせるラベル化法に着目し, 高感度かつ特異的にラベル化可能な機能性ラベル化試薬の分子設計を行うこととした.

タンパク質との反応点としてマレイミド基を有する蛍光ラベル化試薬に着目した. これらは SH 基との反応前後で蛍光強度が変化する例が報告されているがその発蛍光メカニズムは不明である. そこで私はマレイミド基が有する消光能は PeT によるものであると考え, 量子化学計算および還元電位の測定を行ったところ, 共に PeT が起こりうることを示唆する結果を得た. このことから, マレイミド基を有するラベル化試薬は, 電子受容能の高い二重結合が SH 基と反応することで電子受容能の低い反応付加物へと変化し, その結果蛍光を発するというメカニズムを見出した.

続いてこの原理に基づき, より効率の良い蛍光ラベル化試薬の開発を行った. Rehm-Weller 式によると短波長励起が可能な蛍光色素を用いた場合は, 電子移動反応が起こりやすく, 初期の蛍光量子収率が 0 に近くなると予想される. そこで短波長励起が可能かつ水溶液中で蛍光量子収率 ( $\sim 0.9$ ) の高い 7-hydroxycoumarin を蛍光団としたマレイミド基を有する化合物を数種類合成し, 光学特性を検討したところ, Cys の添加前では蛍光を発せず, 添加後に蛍光量子収率の劇的に増加 ( $\Phi = 0.02 \rightarrow 0.75$ ) することが確認された.

以上の結果を踏まえて次にペプチドとの選択性を高めるデザインを施すこととした. 具体的には分子内に反応点であるマレイミド基を 2 箇所にも有する多点認識方式を採用した. 合成した CcnCM2 の構造を Fig. 5 (A) に示す. CcnCM2 は, 初期状態で蛍光を発せず, Cys の添加により蛍光強度が増加した (Fig. 5 (B),  $\Phi = 0.05 \rightarrow 0.77$ ).

続いて分子内に 2 残基の Cys を有するペプチド (Ac-AECACRA-OH, および Ac-AECAACRA-OH) を用いて, CcnCM2 の光学特性を検討した. 横軸に時間を, 縦軸に蛍光強度をプロットした結果を Fig. 5 (C) に示す. SH 基を分子内に一つ有する化合物として *N*-Acetylcysteine (NAC) を用いた. この結果から CcnCM2 は, 分子内に SH 基を 2 カ所にも有するペプチドに対して速やかに反応し, 蛍光強度が増加することが示された.

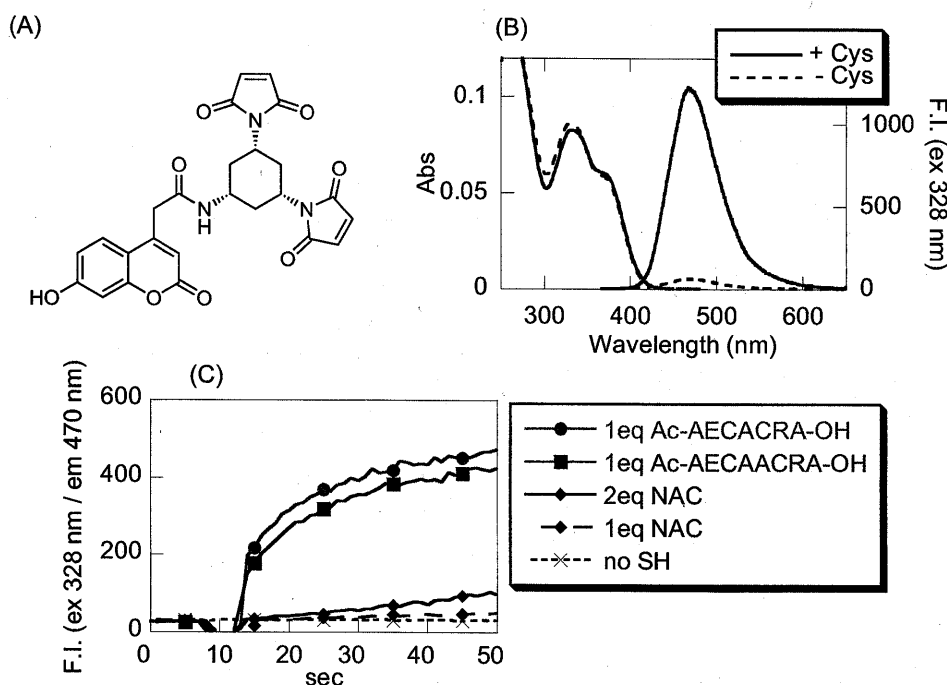


Figure 5 (A) CcnCM2の構造 (B) CcnCM2のCys添加前後におけるスペクトル変化. 10  $\mu$ M CcnCM2に100  $\mu$ M Cys (終濃度)を添加. (C) CcnCM2とペプチドとの反応性を比較した. 5  $\mu$ M CcnCM2にpeptideまたはNACを添加した. 測定条件: 100 mM ナトリウムリン酸緩衝液 (pH 7.4), 37  $^{\circ}$ C.

以上のことから、マレイミド基を有する蛍光ラベル化試薬はPeTの原理に基づいた蛍光制御が可能であることが明らかとなった。今後、ペプチド配列の検討、PeTの理論に基づく蛍光団のさらなる最適化を行うことでさらに高感度かつ高選択的な機能性蛍光ラベル化試薬が開発可能であることが示された。

#### 【結論】

本研究において私は、生体中の機能性分子を可視化するために必要な3種類の新規機能性蛍光プローブの開発を行った。1つには、蛍光団のpH依存的な変化を利用した $Mg^{2+}$ 蛍光プローブは、選択性が高く、細胞内における $Mg^{2+}$ 濃度を選択的に検出することが可能であることが示された。次に、銅イオン蛍光プローブは、PeTを蛍光制御のメカニズムとすることにより50% MeOH/HEPES buffer中において $Cu^{+}$ に応答する蛍光強度増加型銅イオン蛍光プローブの開発に成功した。最後にタンパク質ラベル化試薬については、マレイミド基による蛍光色素の蛍光消光メカニズムがPeTによることを明らかとし、その原理を応用することで、水溶液中における最も蛍光強度比の大きいラベル化試薬および多点認識を利用したCcnCM2の開発に成功した。

#### 【発表論文】

Shoda, T., Kikuchi, K., Kojima, H., Urano, Y., Komatsu, H., Suzuki, K., Nagano, T., *Analyst*, **2003**, 128, 719–723