

論文の内容の要旨

論文題目 Rhodamine spirocycles の閉環／開環平衡に
基づく新規蛍光プローブの開発

氏名 見目 勝

【序論】

蛍光分析法は高感度かつ簡便な手法として、最も広く用いられている代表的な分析手法の一つである。なかでも蛍光バイオイメージングは本来目で見ることの出来ない分子の挙動を時空間分解能を伴った情報として得られる手法であり、生化学分野において非常に重要な役割を果たしている。Fluorescein, rhodamine 等の xanthene 系蛍光分子は長波長の励起・蛍光極大、水溶液中における高い蛍光量子収率などの特長からバイオイメージングに汎用されてきた。これら xanthene 系蛍光分子の 9 位は高い求電子性を持つ為、9 位に carboxyl, amide が求核攻撃をすることで lactone, lactam などの spiro 環を形成し xanthene の共役系がデコンジュゲートされ、可視領域における吸光度・蛍光強度が可逆的に増減することが知られている。このような spiro 環の閉環／開環によって無蛍光から蛍光性へと変化する機能を獲得した蛍光プローブは多数開発されているが、検出対象の適用範囲は限られている上に、生理的な pH の水溶液中で機能する実用的なものは少数しか知られていない。これらの問題点は、蛍光の OFF/ON 制御に利用可能な xanthene 系蛍光分子の spiro 環状骨格が lactone, lactam 以外にこれまでほとんど知られていなかったことに起因すると考えられる。そこで本研究では xanthene 系蛍光分子の spiro 環の閉環／開環に基づく蛍光の OFF/ON 制御を拡張し、lactone, lactam 以外の spiro 環骨格を利用して生理的な pH の水溶液中において生体内分子 (特に酸化活性種; ROS) を検出可能な実用的な蛍光プローブの開発を目指した。

【本論】

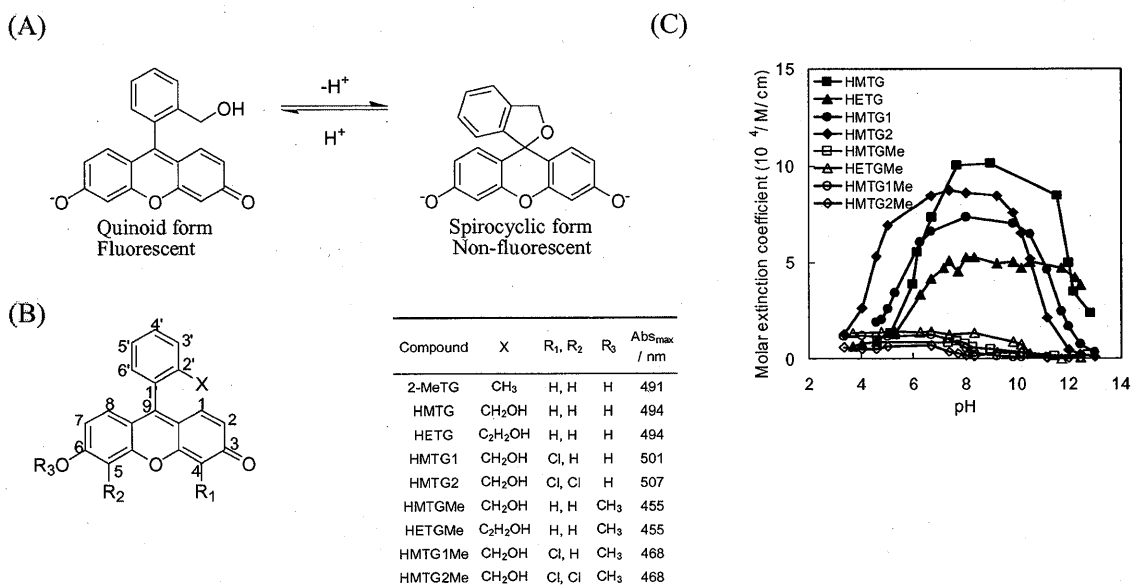


Figure 1. (A) A putative equilibrium of HMTG in aqueous solution. (B) HMTG derivatives. (C) pH profiles of extinction coefficients of HMTG derivatives.

私は水溶液中において fluorescein に匹敵する優れた蛍光特性を持つ TokyoGreen (TG) 類の一種である **hydroxymethylTokyoGreen (HMTG)** を開発し、HMTG の特徴的な溶媒依存性を発見した。HMTG は aprotic 溶媒、塩基性溶媒及びアルカリ性水溶液中において TG 骨格に特徴的な可視吸収および蛍光が可逆的に減少することを発見した。そこで HMTG は xanthene 骨格の 9 位に対して hydroxymethyl 基が求核攻撃することにより spirodihydrofuran 環を形成し、TG 類に特徴的な 400~550nm にかけての吸光度・蛍光強度が可逆的に増減するという仮説を立てた。この現象に注目し、生理的 pH の水溶液中においてより環化性の高い誘導体を見出す為、HMTG の種々の誘導体を合成した (Figure 1)。その結果、TG 骨格の 6 位の phenol を methyl ether 化することで広い pH 領域においてモル吸光係数を減少させる効果が高い事 (すなわち spiro 環状構造をより安定化させる効果が高い) が明らかとなった。この結果から生理的 pH の水溶液中においてより環化性の高い誘導体を開発する為には xanthene 骨格の電荷をコントロールすることによって 9 位の求電子性を高めることが有効であると考えた。更に環化性の高い誘導体を開発する為にはアニオン性蛍光色素 2-MeTG、中性蛍光色素 BODIPY、カチオン性蛍光色素 2-MeTR (2-methylTokyoRed) 等の電荷の状態の異なる色素を比較検討した結果、カチオン性の 2-MeTR が最も spiro 環化の求電子体として適していると考え、tetramethylrhodamine (TMR) 骨格を用いて HMTG 同様に hydroxymethyl 基との相互作用によって spirodihydrofuran 環を形成する分子 **hydroxymethyltetramethylrhodamine (HMTMR)** を開発した (Figure 2B)。

HMTMR の spirodihydrofuran フォームは X 線結晶構造解析によって決定した。HMTMR は有機溶媒中では MeOH や EtOH 等の protic 溶媒中で TMR 骨格に由来する吸光度・蛍光強度を示し、aprotic 溶媒、塩基性溶媒中ではほとんど無色・無蛍光であった。また、水溶液中では酸性から中性の pH において大きな吸光度・蛍光強度を示し、アルカリ性ではほぼ無色・無蛍光であった。

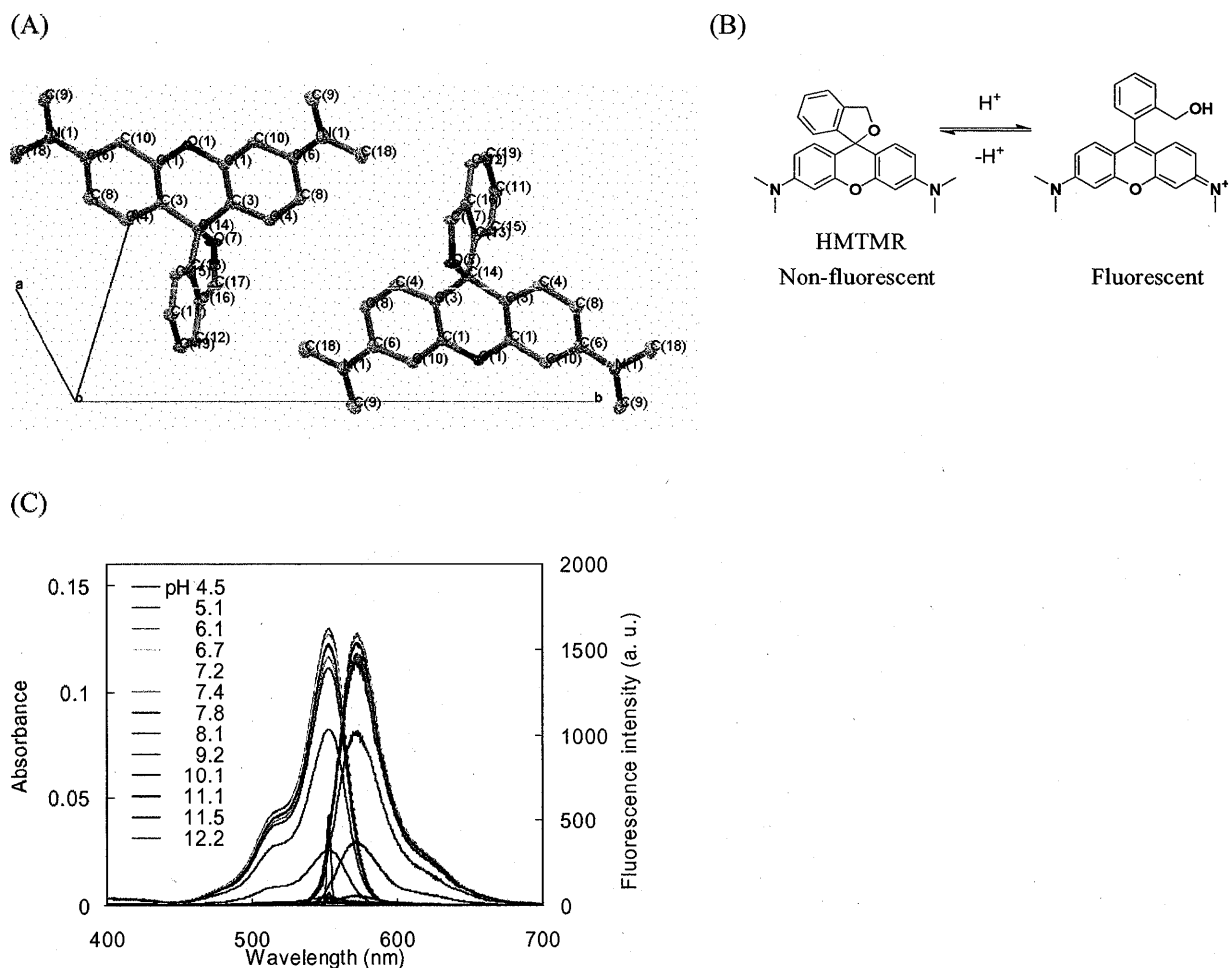


Figure 2. (A) A perspective view of the crystal structure of HMTMR in spirodihydrofuran form. (B) An equilibrium of HMTMR. (C) Absorption and emission spectra of HMTMR 1.0 μM in 0.10 M sodium phosphate buffer.

また、HMTMR の hydroxymethyl 基 (alcohol) を更に求核性の高い mercaptomethyl 基 (thiol) に置換し、(1) 環化性を更に高め、水溶液中において pH 非依存的に完全に無色・無蛍光とすると同時に、(2) 閉環型である dihydrothiophene 環の sulfide 部分が酸化剤との反応点になることを利用して、生体内で産生される ROS との反応で環状構造が解裂し蛍光が増大する機能を付加した分子 HySOx を開発した。HySOx は pH に対して非依存的に無色・無蛍光であった。HySOx も本研究の作業仮説である spiro 環状構造の形成により水溶液中において dihydrothiophene 環状構造を形成していると考えられる。生体内で産生される重要な ROS に対する HySOx の pH 7.4 の水溶液中における検出選択性を調べた結果、HySOx は次亜塩素酸ナトリウムの添加によって大きく蛍光が増大し、その他の ROS を添加してもほとんど蛍光は増大しないことが分かった (Figure 3)。また、HySOx と HOCl との主要な反応生成物を精製し sulfonate 体 (HySO₃H) として同定した。

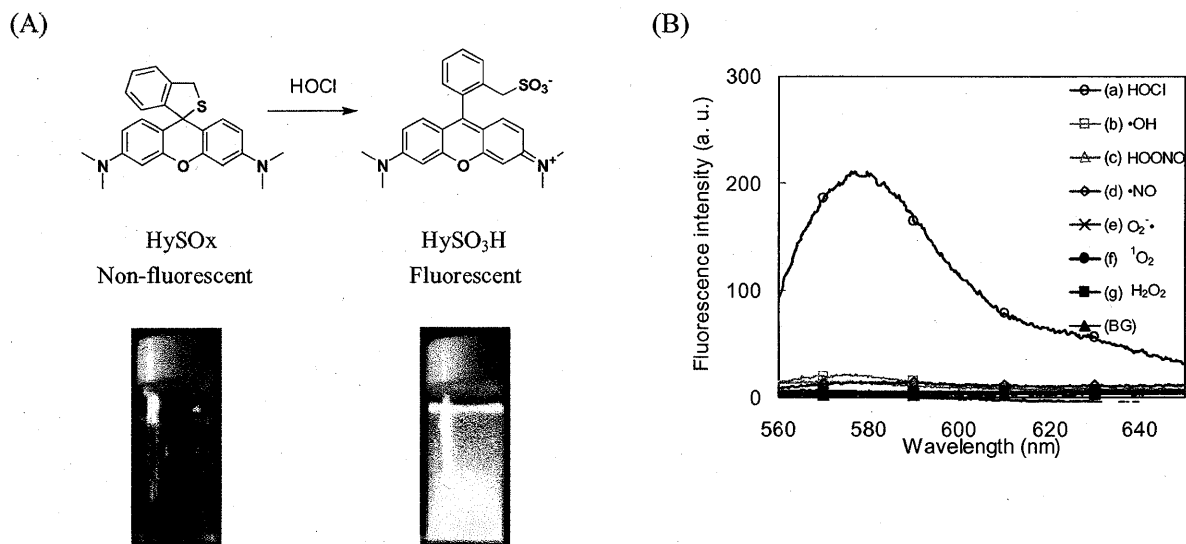


Figure 3. (A) A reaction scheme of HySOx and hypochlorous acid. (B) Emission spectra of HySOx 2.0 μM after addition of various ROS.

HySOx と次亜塩素酸の pH 7.4 のおける反応は非常に速やかかつ定量的であった。また、HySOx、HySO₃H とともに蛍光強度が pH の影響を受けにくいので、HySOx は非常に実用性の高い HOCl 検出プローブであることが示された。HOCl を検出することのできる既存のプローブはいくつか知られているが、HySOx は様々な ROS のうち HOCl を特異的に検出可能な世界初の蛍光プローブである。

以上のように、pH 非依存的にほぼ一定の吸光度・蛍光強度をもつ 2-MeTR をベースとし、hydroxymethyl 基を導入した HMTMR は pH 依存的に閉環／開環の平衡によって吸光度・蛍光強度が可逆的に増減した。更に求核性の高い mercaptomethyl 基を持つ HySOx は pH 非依存的に閉環型を形成しほぼ無色・無蛍光を示した。HySOx と HOC との反応によって生成する sulfonate 体の HySO₃H では、sulfoxyl 基の求核性が低いため HMTMR や HySOx に見られるような spiro 環化は生じない。そのため HySO₃H は pH 非依存的に大きな吸光度・蛍光強度を示した (Figure 4)。

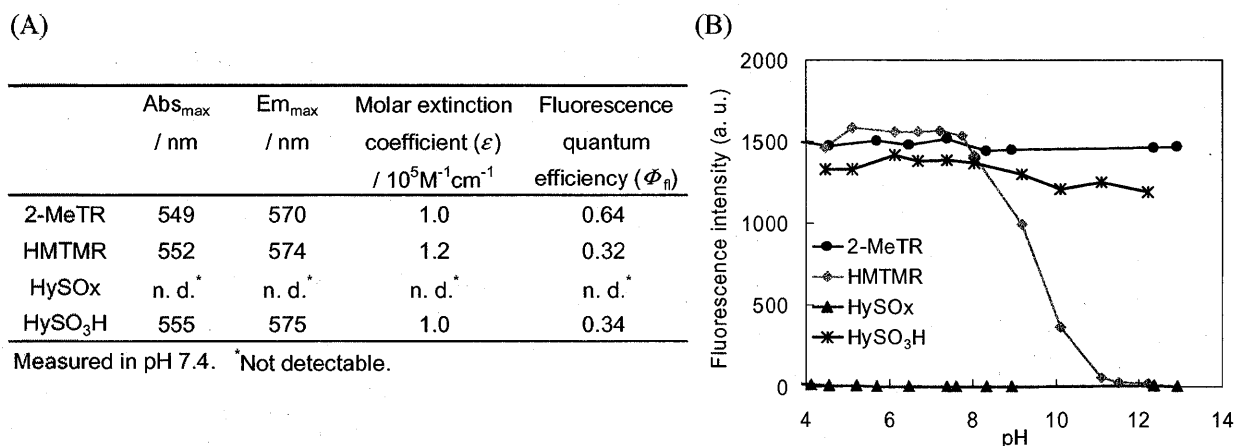


Figure 4. (A) Photochemical properties and (B) pH profiles of tetramethylrhodamine derivatives (1.0 μM) in 0.10 M sodium phosphate buffer.

好中球はサイトカインによる刺激または phagocytosis によって活性化され ROS を産生することが知られている。HySOx をブタ好中球に負荷し、phorbol 12-myristate-13-acetate (PMA) により刺激活性化 (Time = 0 sec) を行うことで発生した HOCl を捉えて HySOx の蛍光が増大した (Figure 5A)。更に PMA 刺激によるこのような蛍光増大をフローサイトメトリー、蛍光イメージングでも観察する事に成功した。

また、*Saccharomyces cerevisiae* 由来 zymosan にオプソニン化を施しブタ好中球に接触させることで phagocytosis によって zymosan が取り込まれ、phagosome 内部で産生される HOCl を捉え HySOx の蛍光が増大する様子を、ビデオとして可視化する事に成功した (Figure 5B)。

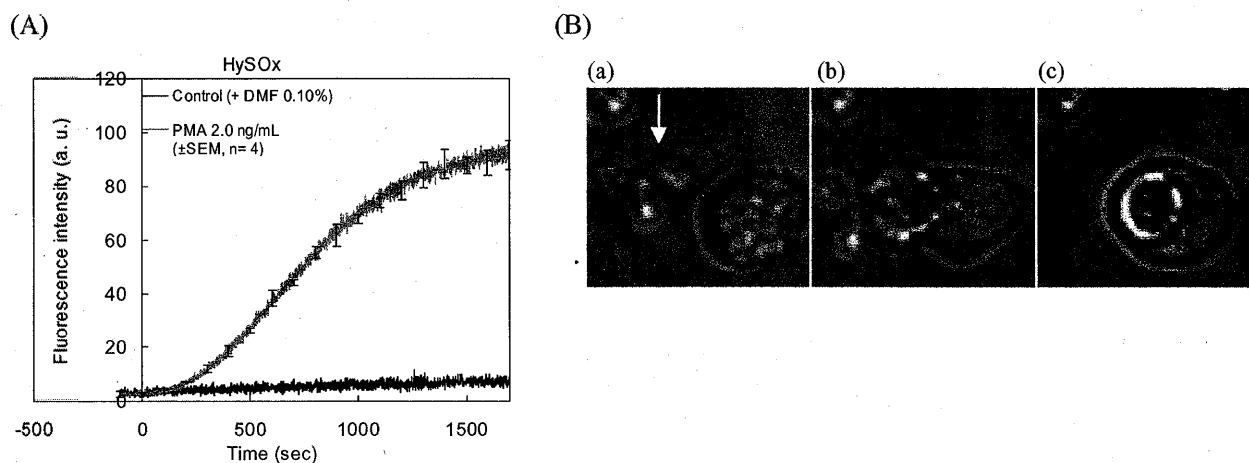


Figure 5. (A) ROS generated by *porcine* neutrophils was detected with HySOx. (B) Confocal fluorescence microscopy images of *porcine* neutrophil. Zymosan is pointed with the arrow.

【結論】

Rhodamine系蛍光色素の spiro 環化性を制御することにより世界で初めての HOCl 特異的蛍光プローブ HySOx を開発した。HySOx は HOCl 特異性、感度、定量性、蛍光強度の pH 非依存性、光褪色耐性などの実用面において非常に優れたプローブである。

HySOx を用いることで PMA 刺激または phagocytosis によって産生される HOCl を可視化することに成功した。HySOx を用いることで HOCl が関与する生理現象に新たな知見が得られるものと期待される。