

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13667

研究課題名(和文) 紫外光励起に対して極限まで耐久性を持たせた青色発光分子の開発とその応用

研究課題名(英文) Development and Application of Blue-Light-Emitting Fluorophores Extremely Stable to Ultraviolet Excitation

研究代表者

井上 将彦 (Inouye, Masahiko)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・教授

研究者番号：60211752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：申請者が開発してきた [3]ロタキサン型蛍光色素の、構造解析、光物性評価、およびバイオイメージングツールとしての可能性の検討を行った。二分子のシクロデキストリンに包接された [3]ロタキサン型アルキニルピレンの単結晶を調製し、X線結晶構造解析によりその包摂様式を観測した。各種溶媒中、および薄膜状態における蛍光発光特性を調査し、異なる環境下でも発光特性が変化しないことを見出した。本分子によりタンパクを蛍光標識した後、タンパクの溶液に連続的に励起光を照射し、紫外可視吸収スペクトルの変化を観測した。その結果、本分子が持つ極めて高い光安定性は、タンパクと共有結合した状態でも健在である事が見出された。

研究成果の概要(英文)：We have developed [3]rotaxane-type fluorophores, in which an alkynylpyrene is encapsulated with two permethyl- $\alpha$ -cyclodextrins (PM- $\alpha$ -CD). Conclusive proof for the [3]rotaxane structure was obtained on the basis of its X-ray structure analysis. This fluorophore showed extremely high photo-stability because PM- $\alpha$ -CD, like bulletproof glass, protected the alkynylpyrene core from the attack of reactive species. Fluorescence spectrum measurement revealed that the [3]rotaxane-type alkynylpyrene emitted only blue light of monomeric pyrene in the various circumstances such as lipophilic, hydrophilic, and even condensed states. Aiming at evolution of the rotaxane-type fluorophore to biomolecule-labeling agents, we synthesized new [3]rotaxane-type alkynylpyrenes with succinimidyl ester. After labeling the protein with this rotaxane, photo-bleaching experiment was executed. It was found that the extremely high photostability of the rotaxane is maintained even after labeling the protein.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：ロタキサン 蛍光色素 高光耐久性 バイオプローブ

## 1. 研究開始当初の背景

有機蛍光色素は、長時間の励起、特に短波長の光での励起により劣化（光褪色）を起こし、発光しなくなってしまう。光褪色は励起状態の発光分子から酸素分子にエネルギー移動が起きて一重項酸素が生じ、これが発光分子と反応してその分子骨格を破壊することにより進行する。この事が有機蛍光色素を発光材料や蛍光バイオイメージングに使用する際問題となり、長時間の使用に耐えうる、高い光安定性を持った有機蛍光色素の開発が望まれている。

申請者は高い蛍光量子収率を持つ蛍光色素として「アルキニルピレン」を開発している。そしてこの発光分子の光安定性をより向上させるため、その周囲を光に透明な Permethyl  $\alpha$ -CD (PM  $\alpha$ -CD) で包接した [3]ロタキサン型発光分子も合成した (図 1、特許: WO2010/026957A1)。本分子は PM  $\alpha$ -CD が防弾ガラスのような役割を果たし、活性酸素種と蛍光色素骨格の接触を抑制するため極めて高い光安定性を示す (UV ハンディランプ使用、半減期: 約 35 日)。

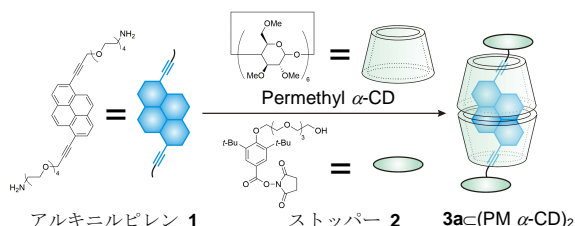


図 1 [3]ロタキサン型アルキニルピレン  $3a$ (PM  $\alpha$ -CD) $_2$  の合成スキーム

今回の研究ではこの [3]ロタキサン型蛍光色素を、発光材料やバイオイメージング用蛍光プローブとして応用する事を目指した。

## 2. 研究の目的

発光材料としての応用可能性を探るために、夾雑物が混在する状態での発光特性や、固体状態での、[3]ロタキサンの発光特性を調査する。

また、バイオイメージング用蛍光プローブとしての可能性を探るために、実際に本色素によるタンパクの蛍光標識を行い、標識した状態での発光特性を調査する。

## 3. 研究の方法

### (1) [3]ロタキサンの光物性等評価

#### ①構造解析

X 線結晶構造解析により、[3]ロタキサン構造における包接様式を観測した。

#### ②発光特性評価

各種溶媒中、および薄膜状態での発光特性を評価した。併せて、PM  $\alpha$ -CD による被覆

が、色素の一重項酸素生成効率に及ぼす影響についても調査した。

### (2) [3]ロタキサンの蛍光プローブとしての応用

[3]ロタキサン型蛍光色素によりタンパクを標識し、標識後の光安定性評価を行った。

## 4. 研究成果

### (1) [3]ロタキサンの光物性等評価

$3a$ (PM  $\alpha$ -CD) $_2$  は柔軟な構造を持ち、結晶化に不向きであると予想されたため、結晶化用の [3]ロタキサン  $3b$ (PM  $\alpha$ -CD) $_2$  を新たに合成した。図 2 に解析結果を示す。軸分子のアルキニルピレンが、ほぼ露出する事なく PM  $\alpha$ -CD により被覆されており、光褪色の主因である酸素分子と接触する余地がないことが分かった。

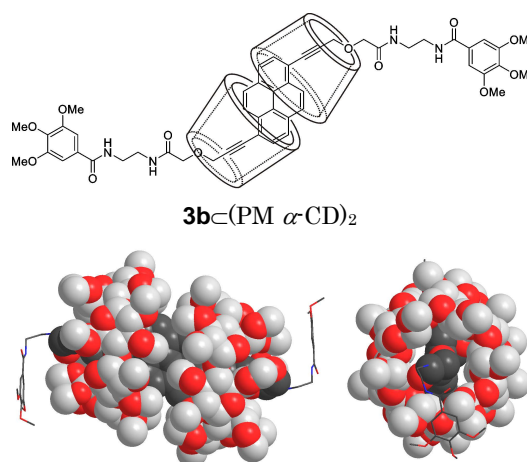


図 2 (上) 結晶化用 [3]ロタキサン  $3b$ (PM  $\alpha$ -CD) $_2$  (下) X 線結晶構造解析。左は側面図、右は上面図

また PM  $\alpha$ -CD による被覆は、高濃度溶液状態や固体状態における、自己会合による消光も抑制すると期待できる。実際、粉末状態での絶対蛍光量子収率を測定したところ、 $\Phi_F = 0.35$  と良好な値であった。また、非包接型のアルキニルピレン  $3a$  は水中や薄膜状態においてはエキシマー発光が支配的であるのに対し、 $3a$ (PM  $\alpha$ -CD) $_2$  はいかなる環境でもモノマー発光のみを示し、蛍光発光スペクトルの形状をほとんど変化させなかった (図 3)。

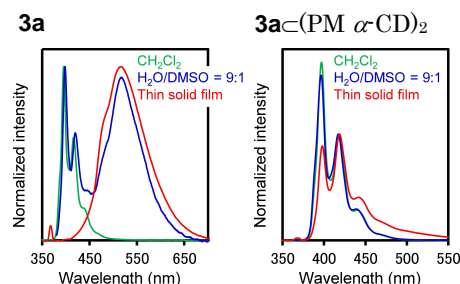
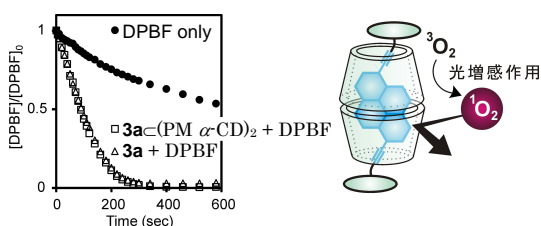


図 3 溶液、薄膜状態における  $3a$ ,  $3a$ (PM  $\alpha$ -CD) $_2$  の蛍光スペクトル 25  $^{\circ}$ C, path length = 1 cm,  $\lambda_{ex} = 366$  nm

有機蛍光色素の光褪色は、①励起された有機蛍光色素からのエネルギー移動により一重項酸素をはじめとした活性酸素種が発生する（光増感作用）、②活性酸素種が蛍光分子と反応し構造を変化させる、という二段階のメカニズムにより進行する。CD による被覆はどちらの段階を抑制しているのか調べる目的で、DPBF (1,3-Diphenylisobenzofuran) を用いて一重項酸素の生成効率を見積もった。DPBF は一重項酸素と速やかに反応し消失するため、DPBF 濃度の経時変化を観測する事で一重項酸素の発生を追跡できる。**3a** $\subset$ (PM  $\alpha$ -CD) $_2$  および **3a** の DPBF 混合溶液に励起光を照射し続けたところ、DPBF 濃度の減少速度は両溶液においてほぼ同じであり、**3a** $\subset$ (PM  $\alpha$ -CD) $_2$  と **3a** は同程度の効率で一重項酸素を生成する事が分かった (図 5)。

すなわち CD による被覆は、②の段階を抑制していると推察され、内包された蛍光分子は CD の壁を隔てて酸素分子へのエネルギー移動は起こすが、CD が“防御壁”の役割を果たすことで一重項酸素の攻撃からは守られている事が分かった。この結果は、CD 内に包接する分子をより酸素へのエネルギー移動を誘発しやすい分子へと変更する事で、本ロタキサン法を劣化を起こさない一重項酸素発生剤の創出にも応用できる事を示唆している。



$[3a\subset(PM \alpha-CD)_2] = [3a] = 20 \mu M$ ,  $[DPBF] = 60 \mu M$  in  $H_2O/DMSO = 2:3$ ,  $25^\circ C$

図 4 DPBF を用いた一重項酸素の生成効率評価

(2) [3]ロタキサンの蛍光プローブとしての応用

上記項目にて示した、ビスエチニルピレンから成る [3]ロタキサン **3a** $\subset$ (PM  $\alpha$ -CD) $_2$  は励起のために紫外光の照射が必要であった ( $\lambda_{max} = 388 \text{ nm}$ )。バイオイメージングにおいて細胞透過性や細胞毒性の観点から、紫外光の照射は好ましくない。そこで、可視光で励起可能な、ビスフェニルエチニルピレンを軸分子とした [3]ロタキサン **4c**(PM  $\alpha$ -CD) $_2$  を新たに設計、合成した。タンパクの持つ Lys 残基との共有結合形成により蛍光標識を行うため、構造中にスクシンイミジルエステルを導入した (図 6)。

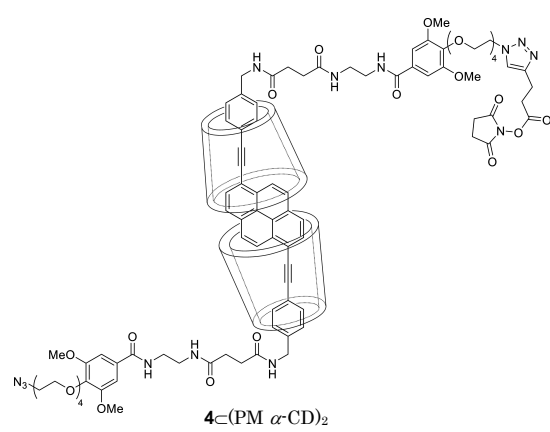


図 5 [3]ロタキサン **4c**(PM  $\alpha$ -CD) $_2$

**4c**(PM  $\alpha$ -CD) $_2$  を用いてタンパクの蛍光標識を行った。標的タンパクには Bovine Serum Albumin (BSA) を選択し、標識の達成は SDS-PAGE により確認した。光安定性調査の比較対象として用いるために、汎用される蛍光色素であるフルオレセインを用いて、同様に BSA の標識を行った。両蛍光色素により標識した BSA の溶液に、それぞれ高圧水銀灯の光を照射し続け、紫外可視吸収スペクトルの経時変化を観測する事で色素の光安定性評価を行った。その結果、フルオレセインの吸収強度の半減期はおよそ 9 時間であったのに対し、**4c**(PM  $\alpha$ -CD) $_2$  は 25 時間照射を続けてもほぼ光褪色を起こさず、BSA に結合した状態でも高い光安定性を示す事が分かった (図 6)。

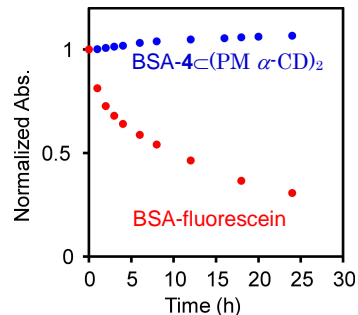


図 6 BSA を標識した蛍光色素の光安定性評価

以上のように、[3]ロタキサン型蛍光色素の構造、物性の精査と、その生体分子標識の応用研究を行った。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)  
① Cyclodextrin-Isolated Alkynylpyrenes as UV-Stable and Blue-Light-Emitting Molecules even in Condensed States  
M. Inouye, A. Yoshizawa, M. Shibata, Y.

Yonenaga, K. Fujimoto, T. Sakata, S. Matsumoto, M. Shiro

*Org. Lett.* **2016**, *18*, 1960–1963. (論文、査読あり)

DOI: 10.1021/acs.orglett.6b00420

[学会発表] (計 8 件)

① ○由澤敦史・井上将彦

短波長励起光に安定なロタキサン型ビスフェニルエチニルピレンの生体分子標識への応用

日本化学会第 97 春季年会

2017/3/16–19, 慶應大学日吉キャンパス (神奈川県・横浜市)

② ○菅原颯馬・林滉一郎・由澤敦史・井上将彦

テンプレートクリック法による青色発光を示すアルキニルピレン型ロタキサンの合成

日本化学会第 97 春季年会

2017/3/16–19, 慶應大学日吉キャンパス (神奈川県・横浜市)

③ ○由澤敦史・井上将彦

Development of [3]Rotaxane-type Bis(phenylethynyl)pyrenes and Their Application to Biomolecular Labeling

感応性化学種が拓く新物質科学 第 2 回国際シンポジウム

2017/3/6–7, 広島大学東広島キャンパス (広島県・東広島市)

④ ○菅原颯馬・林滉一郎・由澤敦史・井上将彦

テンプレートクリック法による高光安定性アルキニルピレン型ロタキサンの合成

第 27 回 基礎有機化学討論会

2016/9/1–3, 広島国際会議場 (広島県・広島市)

⑤ ○由澤敦史・藤本和久・佐方拓馬・松本真哉・城始勇・井上将彦

高い紫外光耐久性と環境非依存的発光特性を示す[3]ロタキサン型アルキニルピレンの開発

日本化学会第 96 春季年会

2016/3/24–27, 同志社大学京田辺キャンパス (京都府・京田辺市)

⑥ ○由澤敦史・伊藤達哉・藤本和久・佐方拓馬・松本真哉・城始勇・井上将彦

分子レベルでの被覆を利用した高光安定性ロタキサン型アルキニルピレンの開発

第 16 回リング・チューブ超分子研究会シンポジウム

2015/10/26–27, 物質・材料研究機構千現地区 (茨城県・つくば市)

⑦ ○由澤敦史・伊藤達哉・藤本和久・井上将彦

環境非応答的にモノマー発光のみを示す高光安定性ロタキサン型アルキニルピレンの開発

第 13 回ホスト・ゲスト化学シンポジウム

2015/6/6–7, 東北大学川内北キャンパス (宮城県・仙台市)

⑧ ○由澤敦史・伊藤達哉・藤本和久・井上将彦

分子レベルで封止された高光安定性アルキニルピレンの創製

感応性化学種が拓く新物質化学 第 4 回公開シンポジウム

2015/5/22–23, 京都大学・宇治おうぼくプラザ・きはだホール (京都府・宇治市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 将彦 (INOUE, Masahiko)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・教授

研究者番号: 60211752

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

藤本 和久 (FUJIMOTO, Kazuhisa)

九州産業大学・工学部・准教授

研究者番号: 40334718

(4) 研究協力者

( )