

平成21年 5月 29日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19750139
 研究課題名 (和文) 生体内遷移金属イオンセンサーの開発と蛍光レシオイメージングへの応用
 研究課題名 (英文) Development of fluorescent sensors for intracellular transition metal ions and their applications to ratiometric imaging
 研究代表者
 多喜 正泰 (TAKI MASAYASU)
 京都大学・大学院地球環境学堂・助教
 研究者番号：70378850

研究成果の概要：生体内における金属イオンの動的挙動を解析するためのツール分子として種々のセンサー分子の開発を行った。その結果、銀、カドミウム、亜鉛、および水銀などの金属イオンに対して特異的な応答を示す分子の開発に成功した。中でもカドミウムイオンセンサーを用いることで、レシオ法による細胞内カドミウムの濃度変化を世界で初めてイメージングすることに成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	0	2,600,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	240,000	3,640,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：生物無機化学・化学センサー

1. 研究開始当初の背景

生体内において金属イオンは様々な生理的反応に関与しており、必須なものであると同時に、その種類や濃度によっては有害な働きを示すものもある。しかしながら、生体内における金属イオンの挙動についてはほとんど明らかになっていない。

2. 研究の目的

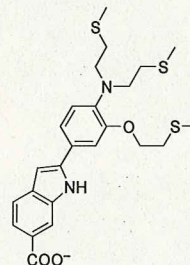
生体内金属イオンの挙動を追跡するため、細胞が生きたままの状態を可視化するための蛍光センサー分子の開発を行うことを目的とする。本研究では特に、銅一価イオン、亜鉛イオン、およびカドミウムイオンに焦点をあてる。蛍光レシオイメージングを可

能とするそれぞれの蛍光センサーを設計し、これを用いた上記遷移金属イオンの細胞内イメージングを行う。

3. 研究の方法

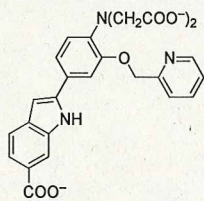
(1) 銅一価イオンプローブ

レシオ型の銅一価蛍光プローブ開発を達成するため、インドールを蛍光団とし、金属イオン認識部位としてチオエーテル基を有する化合物を設計した。合成した化合物については、各種分光学的測定から銅一価蛍光センサーとしての機能を評価した。



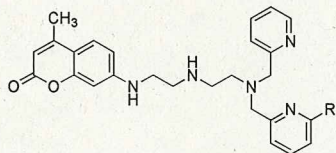
(2) 亜鉛イオンプローブ

前述の銅一価プローブと基本骨格は同じであるが、強いルイス酸性である亜鉛イオンの認識能を高めるため、金属イオンの配位部位をチオエーテルからカルボン酸およびピリジンへと変換した化合物を合成した。得られた化合物については、各種分光学的測定に加え、亜鉛イオンに対する選択性や結合解離定数などの測定を行った。



(3) カドミウムイオンプローブ

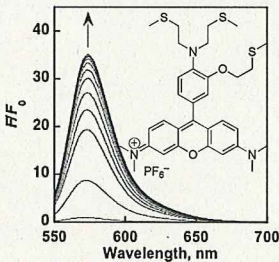
アミノクマリンを基本骨格とし、これに金属イオン配位場を導入した蛍光プローブを設計・合成した。分光学的測定や物理化学特性について検討し、蛍光センサーとしての機能を評価した。さらに生細胞を用いた共焦点蛍光イメージングにより、細胞内におけるプローブ分子の局在化について調べた。最後に、レシオイメージングによって細胞内カドミウムイオンの濃度変化を追跡した。



4. 研究成果

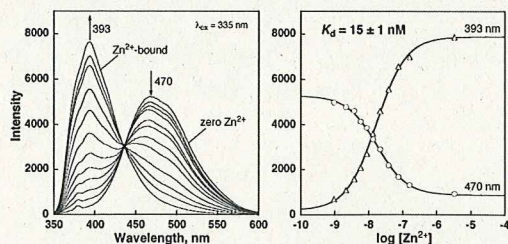
(1) 銅一価イオンプローブ

チオエーテル系配位子を有するインドール型蛍光プローブは、金属イオン非存在下においては青色の発光を示したが、銅一価イオンの添加に伴う蛍光消光が確認された。詳細な検討から、銅一価イオンからの電子供与によってプローブ分子の励起状態がクエンチされていることがわかった。しかしながら、今回設計したチオエーテル系配位子は、銀イオンにも強く配位することが明らかとなり、これを用いることで、世界初の水中で機能する銀イオンセンサーの開発に成功した。



(2) 亜鉛イオンプローブ

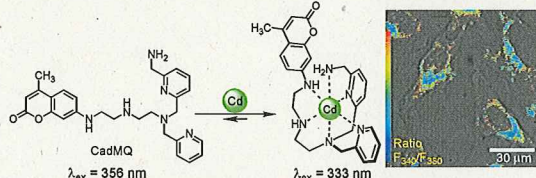
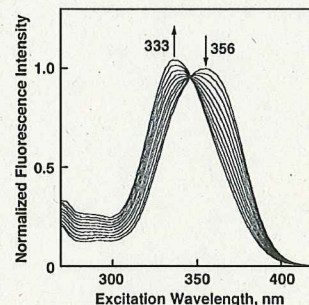
合成した化合物は 470 nm に蛍光極大を有し、亜鉛イオンの添加による大きな短波長シフト ($\Delta \lambda_{em} = 80$ nm) が認められた。この波長シフトは亜鉛イオンに対し選択的であり、高



濃度のアルカリおよびアルカリ土類イオンの影響は全く受けなかった。またこの化合物の亜鉛イオンに対する結合解離定数は 17 nM と求められ、細胞内亜鉛イオンを捕捉するのに十分な値を示すことがわかった。

(3) カドミウムイオンプローブ

カドミウムイオンの有無により蛍光励起波長が変化するレシオ型プローブの開発を行った。金属イオン選択性や pH 変化に対する蛍光応答性はカドミウムイオンプローブとして満足する性質を有していた。加えて、このプローブ分子のカドミウムイオンに対する解離結合定数は 0.16 nM と求め、1ppb 以下のカドミウムイオンを定量的に検知することに成功した。生細胞を用いた実験から、本プローブ分子は細胞膜透過性を有し、且つ細胞内酸性オルガネラに局在化していることがわかった。カドミウム存在下で培養した細胞は、細胞内重金属イオンマスク剤である TPEN を添加することで異なる二波長間のレシオ値に大きな変化が認められた。この結果は、本プローブによる細胞内カドミウムイオン濃度変化の可視化計測に成功したことを意味している。一方、カドミウムイオンの



非存在下では同様な変化は観測されなかった。

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 7 件)

- ① Tasuku Hirayama, Syohei Iyoshi, Masayasu Taki, Yuichiro Maeda, Yukio Yamamoto, Synthesis of a new bifunctionalised fluorescent label and physical properties of the bound form on model peptide of troponin C, *Organic & Biomolecular Chemistry*, **5**, 2040-2045 (2007), 査読有
- ② Shohei Iyoshi, Masayasu Taki, Yukio Yamamoto, A Rosamine-based Fluorescent Chemosensor for Selective Detection of Silver(I) in Aqueous Solution, *Inorganic Chemistry*, **47**, 3946-3948 (2008), 査読有

- ③ Masayasu Taki, Yoshiaki Kawashima, Naoko Sakai, Tasuku Hirayama, Yukio Yamamoto, Effects on Heteroatom Substitution on the Structures, Physicochemical Properties, and Redox Behavior of Nickel(II) Complexes with Pyridine-Containing Macrocyclic Ligands, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, **81**, 590-597 (2008), 査読有
- ④ Tasuku Hirayama, Masayasu Taki, Yukiyasu Kashiwagi, Masami Nakamoto, Atsushi Kunishita, Shinobu Itoh, Yukio Yamamoto, Colorimetric Response to Mercury -induced Abstraction of Triethylene Glycol Ligand from Gold Nanoparticle Surface, *Dalton Transactions*, 4705-4707 (2008), 査読有
- ⑤ Masayasu Taki, Mika Desaki, Akio Ojida, Shohei Iyoshi, Tasuku Hirayama, Itaru Hamachi, Yukio Yamamoto, Fluorescence Imaging of Intracellular Cadmium Using a Dual-Excitation Ratiometric Chemosensor, *Journal of the American Chemical Society*, **130**, 12564-12565 (2008), 査読有

[学会発表] (計 2 4 件)

- ① Masayasu Taki and Yukio Yamamoto
Highly Selective Ratiometric Fluorescent Probe with Picomolar sensitivity for Cadmium
13th International Conference on Biological Inorganic Chemistry, Vienna, Austria, 2007 年 7 月 15-20 日
- ② 多喜正泰・出崎美佳・山本行男
アミノクマリンを骨格とした新規レシオ型カドミウム蛍光プローブの開発
第 22 回生体機能関連化学シンポジウム, 東北大学, 2007 年 9 月 28 日
- ③ Masayasu Taki and Yukio Yamamoto
Membrane-permeable Fluorescent Chemosensor for Ratiometric Imaging of Cadmium in Living Cells
Biomimetics Conference, Doshisha, Kyoto, Japan, 2007 年 12 月 20 日
- ④ 伊吉祥平・多喜正泰・山本行男
チオエーテル含有多座配位子を用いた銀および銅(I)錯体の構造と発光特性
第 58 回錯体化学討論会, 金沢大学, 2008 年 9 月 21 日
- ⑤ Shohei Iyoshi, Masayasu Taki, Akio Ojida, Itaru Hamachi, Yukio Yamamoto
Ratiometric Fluorescence Imaging of Intracellular Cadmium Using a Coumarin-based Chemosensor

The 4th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference, Jeju, Korea, 2008 年 11 月 10-13 日

[その他]

<http://www.users.kudpc.kyoto-u.ac.jp/~t50544/>

http://www.h.kyoto-u.ac.jp/staff/321_taki_m_0_j.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

多喜 正泰 (TAKI MASAYASU)

京都大学・大学院地球環境学学・助教

研究者番号：70378850