

平成21年 6月10日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19890252

研究課題名（和文） グルタミン酸を特異的に検出する蛍光プローブの開発

研究課題名（英文） Development of Fluorescence Probe for Selective Detection of Glutamate

研究代表者

塚本 効司 (KOJI TSUKAMOTO)

兵庫医療大学・薬学部・助教

研究者番号：00454794

研究成果の概要：生体内で神経伝達物質等の重要な役割を担うグルタミン酸を高感度に検出するため、グルタミン酸が存在すると蛍光を発する「グルタミン酸蛍光プローブ」を開発した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,320,000	0	1,320,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,670,000	405,000	3,075,000

研究分野：分析化学

科研費の分科・細目：医歯薬学・物理系薬学

キーワード：分析化学、可視化、分子認識

1. 研究開始当初の背景

(1) 可視化技術における世界的動向

「生きた細胞内」において、ある物質が「いつ」、「どこで」、「どれだけ」生成し機能するかを知ることは、生命現象を解明するために必要不可欠である。その要望に答えるのが物質の可視化技術である。そして物質を捉えて蛍光シグナルを発する、可視化技術の中心的ツールが蛍光プローブである。近年、ハード面での可視化計測技術は急速な進歩を遂げているが、それを最大限に活用できる高性能な蛍光プローブの開発研究は端緒についたばかりであり、世界的に急務な課題として取り組まれている。

(2) L-グルタミン酸の重要性

L-グルタミン酸（以下、グルタミン酸と称す）は全ての生物細胞における代謝中間体であると同時に、高等動物の中樞神経系における主要な興奮性神経伝達物質であり、脳神経系の情報伝達に関与している。さらに、「記憶と学習」においてグルタミン酸受容体の重要性が示唆されている。これらの重要な役割を担う一方で、グルタミン酸はその興奮作用によって脳神経にダメージを与え、脳卒中およびアルツハイマー病やパーキンソン病など種々の神経変性疾患を引き起こすと考えられている。

このようにグルタミン酸は生体内におい

て極めて重要な物質であるにもかかわらず、その動態や作用メカニズムに関しては不明な点が多々ある。それらを解明するには、生きた細胞内においてグルタミン酸を可視化計測する必要があるが、可視化計測に必要なグルタミン酸蛍光プローブは未だに開発されていない。

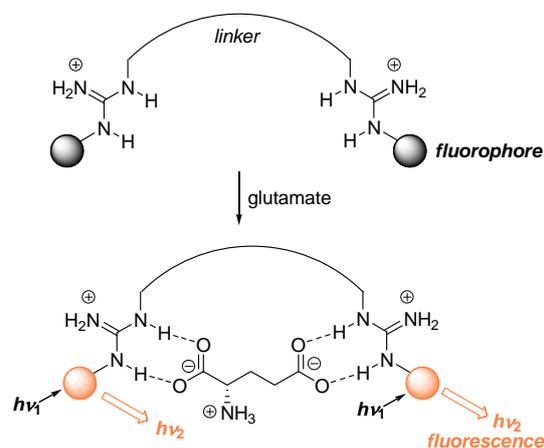
2. 研究の目的

グルタミン酸を特異的に認識して蛍光を発するプローブを開発し、グルタミン酸のイメージング技術に資するツールを提供すること。

3. 研究の方法

グルタミン酸蛍光プローブを設計、合成し、そのグルタミン酸結合能や蛍光特性を調べていくことにした。

グルタミン酸蛍光プローブの設計の概略を Scheme 1 に示した。



Scheme 1

グアニジノ基は水素結合および静電相互作用によりカルボキシアニオンと結合しやすいことが知られている。2つのグアニジノ基を適切なリンカーで結んだ分子は、カルボキシル基を2つ有するグルタミン酸と強く結合すると考えた。さらに、グアニジノ基の近傍に蛍光色素を組み込めば、グルタミン酸の結合により蛍光特性が変化すると考えた。

4. 研究成果

(1) グアニジノ基を利用したグルタミン酸蛍光プローブの開発

Scheme 1 の設計に従い化合物 **1** を合成した。蛍光色素部位は 7-アミノクマリン誘導体を選択した。合成した **1** の蛍光特性を調べた結果、**1** にグルタミン酸を加えると蛍光強度が増大することが明らかになった (Figure 1)。

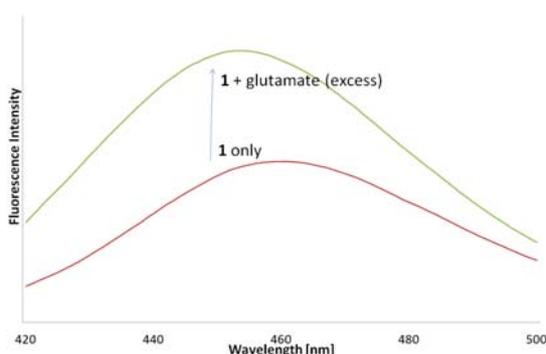
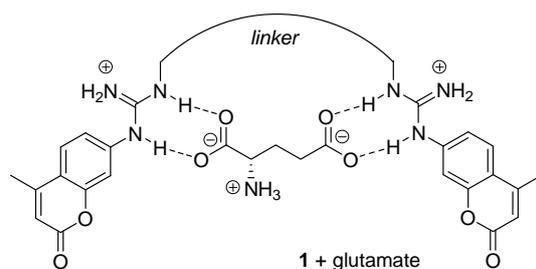


Figure 1 Fluorescence spectra of **1** in response to glutamate in DMSO. $\lambda_{\text{ex}} = 350$ nm.

グアニジノ基を利用したグルタミン酸レセプターの開発は数例報告されているが、蛍光プローブに応用された例はこれまでなく、**1** は新規グルタミン酸蛍光プローブとして利用できると考えられる。

(2) 水中で機能するグルタミン酸蛍光プローブの開発

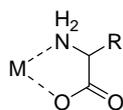
上記の通り、**1** はグルタミン酸に対して蛍光応答を示す。しかしながら、DMSO-水混合溶媒中の水の割合を大きくするにつれて蛍光強度が大幅に減少していき、最終的にはグルタミン酸に対する蛍光応答が見られなくなることを判明した。最終目標は生細胞中や生体内でグルタミン酸をイメージングすることであるが、そのためには水中で機能することが重要である。よって、水中でも機能するプローブを再設計することにした。

グルタミン酸との結合能を高めるため、当初は **1** のジグアニジウム骨格に、さらに水素結合部位を導入するなどの化学修飾を行うこととし、様々な **1** の誘導体合成を行った。しかしながら、合成法が非常に複雑なものになったばかりでなく、合成できた複数の誘導体に関しても水中でのグルタミン酸結合能が改善されたものがなかった。

このことから、グアニジノ基を利用したプローブ合成を断念し、新たな設計にもとづいたプローブを開発することにした。

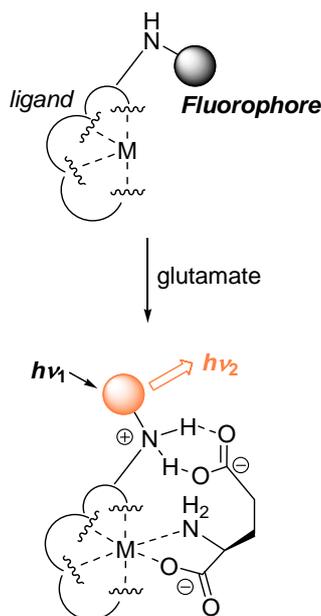
α -アミノ酸は1つの炭素原子にアミノ基と

カルボキシル基を有しているため、遷移金属に対して二座配位子として結合できると考えられる (Scheme 2)。



Scheme 2

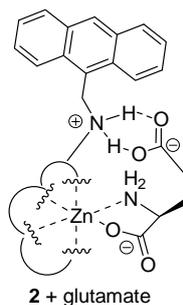
このような遷移金属に対する配位能を利用して Scheme 3 のようにプローブ分子を設計した。



Scheme 3

設計したプローブ分子は、遷移金属を保持するリガンド部位と蛍光シグナルを発する蛍光色素部位、および遷移金属から成る。グルタミン酸が存在すると、まずグルタミン酸が金属と配位結合すると考えられる。そして、適切な位置に配置された蛍光色素近傍の窒素原子がグルタミン酸の ω -カルボキシル基と水素結合することにより、蛍光色素の蛍光特性が変化し蛍光シグナルとして検出できるものと考えた。

この設計に従い、**2** を合成して水中における蛍光特性を調べた。



2 + glutamate

その結果、**2** にグルタミン酸を加えると蛍光強度が増加することが明らかになり、望みのプローブとしての機能を有することが分かった (Figure 2)。

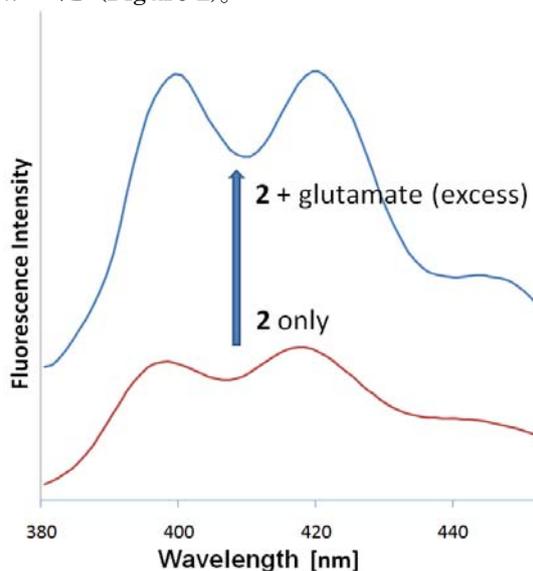


Figure 2 Fluorescence spectra of **2** in response to glutamate in water. $\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$.

2 は、グルタミン酸非存在下での蛍光強度が高い、蛍光収率が低い、グルタミン酸に対する応答が小さい等、プローブの実用性という観点からは問題点が多い。しかしながら、水中で機能する低分子グルタミン酸蛍光プローブはこれまでに報告例がないため、**2** は今後のプローブ開発における「種」としての意義がある。今後、リガンド部位や蛍光色素の改良を行うことで、真に実用的な蛍光プローブの開発に繋がると期待できる。

(3) 本研究から派生したその他の成果：水銀プローブの開発

前述のプローブ開発において、プローブの合成時に作成した合成中間体が、水銀イオンに対して強い蛍光応答を発現することを発見した。

この知見を基に、本合成中間体やその誘導体を種々合成して水銀に対する蛍光応答を検討した結果、高選択的かつ高感度の水銀蛍光プローブの開発に成功した (Figure 3)。

水銀は高い毒性を有しているため、高感度な検出法の開発が強く求められており、検出ツールとしての水銀蛍光プローブの開発が現在盛んに行われている。今回開発したプローブは、感度や選択性といった機能面で既存の報告例と同等以上の性能を有している上、合成が容易である点も優れている。

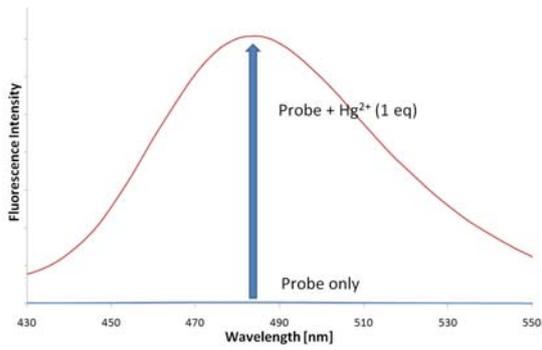


Figure 3 Fluorescence spectra of the developed probe in response to mercury(II) ion. $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$.

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)

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚本 効司

兵庫医療大学・薬学部・助教

研究者番号：00454794

(2) 研究分担者

特になし

(3) 連携研究者

特になし