

機関番号：12601  
 研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21750135  
 研究課題名 (和文) 蛍光プローブ・デンドリマー複合体の創製と、細胞および動物個体イメージングへの応用  
 研究課題名 (英文) Development of fluorescent probes -dendrimer conjugates and their application for cell and in vivo imaging  
 研究代表者  
 寺井 琢也 (TERAI TAKUYA)  
 東京大学・大学院薬学系研究科・助教  
 研究者番号：00508145

研究成果の概要 (和文)：蛍光プローブの基本骨格として汎用されている BODIPY にアミノ基を導入することにより化合物の吸収蛍光特性が大きく変化することを見出し、この現象を利用した蛍光プローブの開発に成功した。更に、蛍光団と Fréchet タイプデンドリマーとの複合体を合成し、イメージングに向けた基礎検討を行った。また、近赤外領域に発光を有する希土類金属錯体が、アンテナ部位の構造によって細胞内に導入されることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：In this study, we discovered that introduction of amino groups to BODIPY resulted in remarkable alternation of its absorption and fluorescence spectra, and based on this finding, succeeded in the development of several fluorescent probes. Furthermore, we synthesized conjugates of BODIPYs and Fréchet type dendrimers for fluorescence imaging applications. Also, we found that some luminescent lanthanide complexes with near-infrared emission could be introduced to live cells, depending on the structure of their antenna moiety.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・機能物質化学

キーワード：センサー、蛍光イメージング、デンドリマー

#### 1. 研究開始当初の背景

蛍光プローブとは、標的分子と特異的に反応してその蛍光強度や励起・蛍光波長が変化する機能性分子のことである。蛍光プローブは、標的分子の試験管内での定量のみならず、生細胞や動物個体中における可視化解析に対しても非常に有用であり、これまでに  $\text{Ca}^{2+}$  を初めとする様々な生理活性分子に対するプローブの開発が行われてきた。

現在汎用されている蛍光プローブを大別

すると、有機分子を用いた化学プローブと蛍光タンパク質を用いた遺伝子プローブとに分けられる。このうち、化学プローブは遺伝子操作が不要であり反応前後の蛍光変化が大きいという利点を有している一方、蛍光色素自体の性質に起因する細胞内(外)局在の制御が難しいという問題点を抱えている。例えば代表的な可視光励起蛍光団の一種である BODIPY (boron dipyrromethene) 類は、その脂溶性の高さから細胞内の内膜系小器官

(ゴルジ体、小胞体など)に集積しやすく、細胞質に存在する酵素やイオンを標的としたプローブを開発する場合には、試験管内では狙い通り機能するにもかかわらず細胞へと適用した場合には標的分子と反応できない、というケースがしばしば見受けられる。更に、時間分解蛍光測定法により高いS/Nでの蛍光分析を可能とする希土類金属錯体などの水溶性蛍光プローブを用いる場合にも、プローブが細胞膜を透過できないためにイメージングへの応用が制限されることが多かった。

## 2. 研究の目的

前項の問題点を解決することができれば、化学プローブの分子設計がより自由に行えるようになり、優れた性質を有するプローブの開発につながると考えられる。そこで研究代表者は、局在が問題となり得る上述の蛍光団を用いた新たなプローブの開発を行うと共に、それらのプローブを dendrimer 等の高分子と結合させる新たな手法によって細胞導入性や細胞内局在を制御し、細胞および動物個体の蛍光イメージングに向けた基礎検討を行うことを目的として研究を行った。具体的には、BODIPY を基本骨格とする新たな蛍光プローブの開発、近赤外領域に発光を有する新たな長寿命蛍光プローブの開発、dendrimer・蛍光団複合体の開発と機能評価、の3点について主に研究を実施した。

## 3. 研究の方法

### (1) BODIPY を基本骨格とする新たな蛍光プローブの開発

BODIPY に対して直接かつ非対称にニトロ基、アミノ基、及びアルキルアミノ基を導入した各種化合物 (図 1A) を合成し、各種溶媒中における吸光・蛍光スペクトルを測定した。また、金属イオンに対する配位能を有する置換基を導入した化合物 (図 1B) も合成し、様々な金属イオン存在下における測定を行った。開発したプローブの一部は細胞イメージングへと適用し、共焦点蛍光顕微鏡を用いた局在解析を実施した。

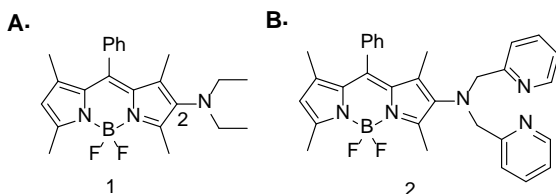


図 1. 合成した化合物 (一部)

### (2) 近赤外領域に発光を有する新たな長寿命蛍光プローブの開発

$\text{Yb}^{3+}$  や  $\text{Nd}^{3+}$  といった希土類金属イオンは、可視光領域に吸収を持つ吸光団 (アンテナ)

からのエネルギー移動により近赤外発光を示すことが知られている。そこで BODIPY と配位子 (DTPA) を連結した化合物を設計・合成し、希土類金属イオンと錯形成させた (図 2)。更に、分子内での光誘起電子移動 (PeT) による発光強度制御を目指し、8 位フェニル基にアルキルアミノ基を導入した錯体 **3** も合成した。合成した錯体についてはスペクトル測定を行うと共に、細胞イメージングも試みた。

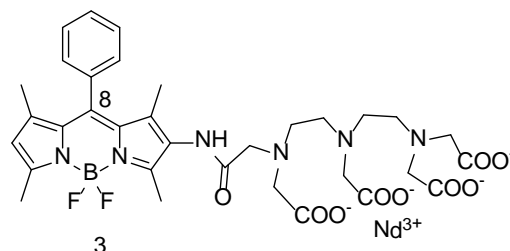


図 2. 開発した錯体 **3** の構造

### (3) dendrimer・蛍光団複合体の開発と機能評価

末端にヒドロキシル基もしくはそのシリル保護体を有する第 3 世代 Fréchet タイプ dendrimer を合成し、脂溶性蛍光団との結合を行った。そして、末端官能基の性質による水溶性の変化を見積ると共に、簡単な細胞イメージングも行った。尚、本項目は博士研究員の相良剛光氏と共同で実施した。

## 4. 研究成果

### (1) BODIPY を基本骨格とする新たな蛍光プローブの開発

BODIPY の 2 位にニトロ基を導入した化合物は親化合物と類似した性質を示した一方で、ジエチルアミノ基を導入した化合物 **1** においては吸収波長の長波長シフトと蛍光量子収率の大幅な低下が観察された。しかし、酸性条件下でアミノ基がプロトン化された場合には吸収波長が短波長側に移行し、蛍光強度も増大した (図 3)。即ち、2-アルキルアミノ BODIPY は吸収・蛍光の両方が変化する pH 指示薬として機能することが判明した。またこの吸光・蛍光変化は水溶液中だけでなく、プロトン性・非プロトン性を問わず様々な有機溶媒中で同様に観察された。詳細な機構については不明であるが、アミノ基からの分子内電荷移動が関与している可能性が考えられる。

次に化合物 **2** の性質について調べたところ、 $\text{Cu}^{2+}$  選択的に吸収スペクトルが可逆的にシフトすることが分かった (図 4)。この変化は肉眼でも十分観察可能であることから、銅イオンの簡便な検出法として環境分析等の分野において有用と期待される。

最後に、これらのプローブの細胞内局在に

ついて検討したところ、一般的な BODIPY 類と同様に内臓系小器官に局在することが示唆された。

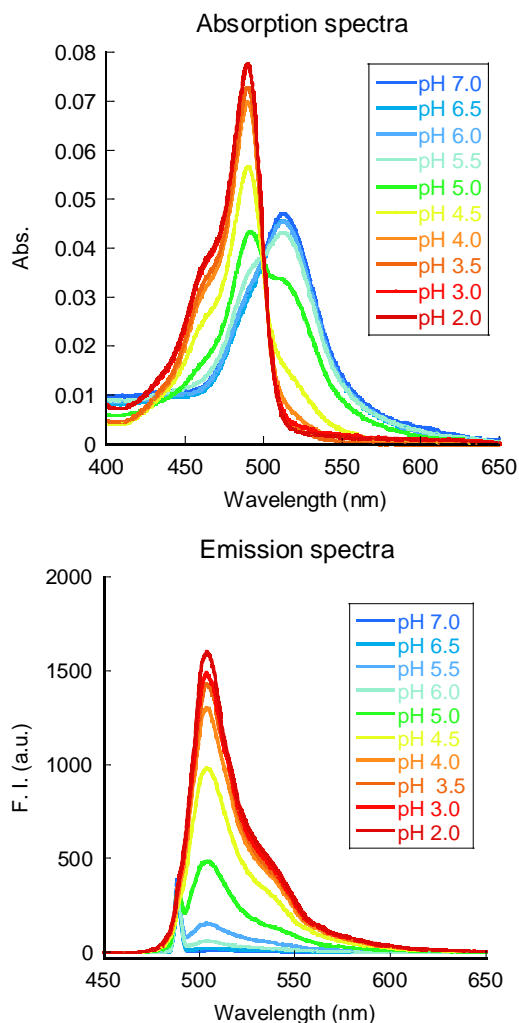


図 3. 化合物 1 の吸収 (上) および蛍光 (下) スペクトル  
(リン酸緩衝液中、490 nm 励起)

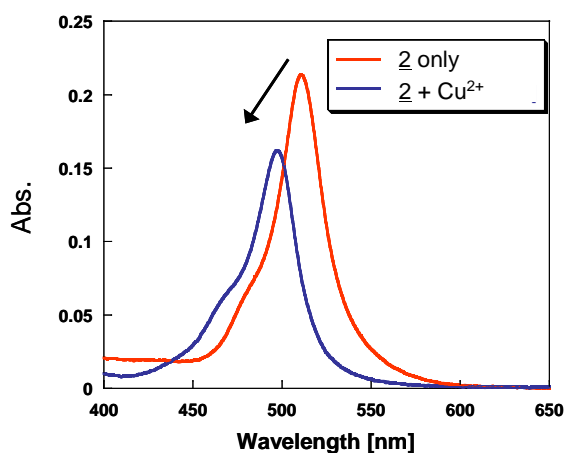


図 4. 化合物 2 の吸収スペクトル  
(DMSO を含む水溶液中)

(2) 近赤外領域に発光を有する新たな長寿命蛍光プローブの開発

合成した錯体 **3** について、水溶液中および有機溶媒中で  $\text{Nd}^{3+}$  の発光スペクトル (励起波長 500 nm) を測定したところ、 $4\text{F}_{3/2} \rightarrow 4\text{F}_{9/2}$  並びに  $4\text{F}_{3/2} \rightarrow 4\text{F}_{11/2}$  遷移に起因する、880 nm と 1060 nm の発光ピークが見られた (図 5)。また励起スペクトルの形状から、この発光が BODIPY からのエネルギー移動を介したものであることが示された。更に、8 位ベンゼン環にアルキルアミノ基を導入した錯体 **4** について pH による発光強度の変化を調べたところ、中性および塩基性条件下ではほとんど発光が観察されなかった一方で、酸性環境では強い発光が見られた。このことは、**3** を基盤とする  $\text{Nd}^{3+}$  錯体の発光強度が PeT により制御できることを示している。なお、我々の知る限り **4** は  $\text{Nd}^{3+}$  を中心金属とする初の発光性 pH センサーである。今後、アルキルアミンに替えて様々な反応点を導入することにより、多様な分子種を標的とするプローブの開発が見込まれる。

ところで、**3** と同様に BODIPY と DTPA を結合させた錯体を細胞へロードしたところ、予想に反して細胞内から強い蛍光が観察された。一般に、希土類金属錯体は水溶性が高く細胞への導入が難しいとされているが、近年の研究では、アンテナもしくは配位子の脂溶性が高い場合や正電荷を有している場合には細胞内へと導入される例も示されている。今回の場合にも、BODIPY 部分の脂溶性に起因する受動拡散により細胞内へと導入されていることが考えられる。この手法の一般性に関しては更なる検討が必要であるが、近赤外発光を有する希土類錯体の細胞内導入は前例が無く、興味深い成果と言える。

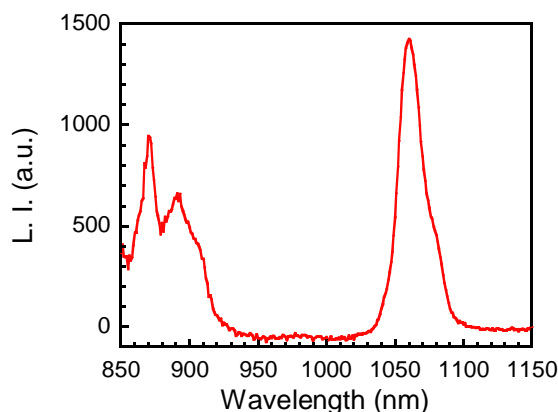


図 5. 錯体 3 の発光スペクトル

(3) デンドリマー・蛍光団複合体の開発と機能評価

合成した複合体の溶解性について検討したところ、末端ヒドロキシル基が保護されているデンドリマー複合体は有機溶媒にのみ

可溶であるのに対し、ヒドロキシル基が脱保護された複合体は水溶液にも溶解した。また、HeLa 細胞を用いたイメージングの結果から、ヒドロキシ基が脱保護された複合体は、蛍光団の脂溶性の高さにもかかわらず細胞外に滞留することが判明した。この結果は、デンドリマー等の高分子を利用することにより蛍光団の性質に因らないプローブの局在制御が可能であることを示している点で、本研究の目的に適うものと言える。今後、末端官能基を様々に変換することで、細胞内の特定の小器官へとプローブを伝達することが可能になるものと期待される。

#### 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 6 件)

全て査読あり

(1) "Design and Synthesis of a Novel Fluorescence Probe for  $Zn^{2+}$  Based on the Spirolactam Ring-opening Process of Rhodamine Derivatives" Hiromi Sasaki, Kenjiro Hanaoka, Yasuteru Urano, Takuya Terai and Tetsuo Nagano, *Bioorg. Med. Chem.*, **19**, 1072-1078 (2011).

(2) "Hypoxia-sensitive Fluorescent Probes for in vivo Real-time Fluorescence Imaging of Acute Ischemia" Kazuki Kiyose, Kenjiro Hanaoka, Daihi Oushiki, Tomomi Nakamura, Mayumi Kajimura, Makoto Suematsu, Hiroaki Nishimatsu, Takehiro Yamane, Takuya Terai, Yasunobu Hirata and Tetsuo Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 15846-15848 (2010).

(3) "A Time-Resolved Fluorescence Probe for Dipeptidyl Peptidase 4 and its Application for Inhibitor Screening" Mitsuyasu Kawaguchi, Takayoshi Okabe, Takuya Terai, Kenjiro Hanaoka, Hirotatsu Kojima, Izumi Minegishi and Tetsuo Nagano, *Chem. Eur. J.*, **16**, 13479-13486 (2010).

(4) "Development of Luciferin Analogues Bearing an Amino Group and Their Application as BRET Donors" Hideo Takakura, Kiyoshi Sasakura, Tasuku Ueno, Yasuteru Urano, Takuya Terai, Kenjiro Hanaoka, Takashi Tsuboi and Tetsuo Nagano, *Chem. Asian J.*, **5**, 2053-2061 (2010).

(5) "Sensitive Detection of Acrolein in Serum Using Time-resolved Luminescence" Masataka Togashi, Yasuteru Urano,

Hirotatsu Kojima, Takuya Terai, Kejiro Hanaoka, Kazuei Igarashi, Yasunobu Hirata and Tetsuo Nagano, *Org. Lett.*, **12**, 1704-1707 (2010).

(6) "Development of 2,6-Carboxy-Substituted Boron Dipyrromethene (BODIPY) as a Novel Scaffold of Ratiometric Fluorescent Probes for Live Cell Imaging" Toru Komatsu, Yasuteru Urano, Yuuta Fujikawa, Tomonori Kobayashi, Hirotatsu Kojima, Takuya Terai, Kenjiro Hanaoka and Tetsuo Nagano, *Chem. Commun.*, 7015-7017 (2009).

〔学会発表〕(計 25 件)

主要なもののみを記載

(1) 寺井琢也、「光誘起電子移動による希土類金属錯体の発光制御とセンサーへの応用」、2010 年光化学討論会、2010 年 9 月 10 日、千葉

(2) Takuya Terai, "Quenching of infrared luminescent lanthanide complexes by intramolecular photoinduced electron transfer", 23rd IUPAC symposium in photochemistry, July 13, 2010, Ferrara (Italy)

(3) 寺井琢也、「酸性環境を認識する近赤外発光性希土類金属錯体の開発」、日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 29 日、岡山

(4) 寺井琢也、「創薬研究への応用を目指した蛍光プローブの開発」、日本化学会 第 90 春季年会、2010 年 3 月 26 日、大阪

(5) Takuya Terai, "Development of fluorescent probes for HTS", Screening Europe 2010, February 11, 2010, Barcelona (Spain)

(6) 寺井琢也、「赤外領域に発光を有する新規水溶性希土類金属錯体の開発」、第 59 回錯体化学討論会、2009 年 9 月 25 日、長崎

(7) Takuya Terai, "A Novel Screening Method of Protein Kinase Inhibitors Based on Fluorescent Probes", 25th Naito Conference on Chemical Biology, September 10, 2009, Sapporo (Japan)

(8) Takuya Terai, "Development of functional luminescent lanthanide complexes for medical and pharmaceutical applications", 7th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium, August 26,

2009, Cairns (Australia)

(9) 寺井琢也、「近赤外領域に発光を有する新規希土類金属錯体の開発」、日本ケミカルバイオロジー学会 第4回年会、2009年5月19日、神戸

(10) 寺井琢也、「近赤外領域に蛍光を有する希土類金属錯体の開発」、日本分子イメージング学会 第4回学術集会、2009年5月15日、東京

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~tlong/Japanese/top.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

寺井 琢也 (TERAI TAKUYA)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号：00508145