

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21750168

研究課題名（和文） 光誘起電子移動機構に基づく銅一価蛍光プローブの創製と細胞イメージングへの応用

研究課題名（英文） Development of copper(I) fluorescent sensors based on photoinduced electron transfer mechanism and their application to optical imaging of cells

研究代表者

多喜 正泰 (TAKI MASAYASU)

京都大学・地球環境学堂・助教

研究者番号：70378850

研究成果の概要（和文）：チオエーテル部位を含む様々な配位子を合成し、対応する銅一価錯体を調製した。各種分光学的測定やX線結晶構造解析から、配位子のリンカー長は銅一価イオンの結合定数、結合様式、および酸化還元挙動に大きな影響を与えることがわかった。次に、還元型フルオレセインに四座配位子を組み込んだ化合物を合成した。グルタチオン存在下で銅一価イオンを添加すると、フルオレセイン由来の強い蛍光が観測された。また、同様の反応は細胞内においても進行することがわかり、細胞内銅一価イオンの検出に有効なツール分子であることがわかった。

研究成果の概要（英文）：We have developed copper(I)-selective fluorescent probes as a chemical tool for monitoring behavior of copper ions in living cells. We initially synthesized various thioether-containing ligands and prepared the corresponding copper(I) complexes. Spectroscopic measurements and X-ray crystal structure analysis of these copper(I) complexes indicate that the linker chain length of the thioether ligand strongly affect the affinity toward copper(I) ion, binding fashion, and redox potential of copper. We next developed novel copper(I) fluorescent probes based on the oxidative cleavage mechanism. These probes contain a reduced form of fluorescein and TPA tetradentate ligand, those are linked through a benzyl ether group. We found that strong fluorescence is observed when copper(I) is added to the probe solution containing sub mM of glutathione in water. The same reaction undergoes even in cells. Therefore, this will be useful chemical tool to probe intracellular copper(I) ion behavior.

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・生体関連化学

キーワード：生物無機化学・バイオセンサー

1. 研究開始当初の背景

| 生体にとって必須の微量元素イオンの一つ

である銅イオンの多くはタンパク質に取り込まれ、酵素反応や電子伝達など様々な機能を司っている。しかしながら、生体内における銅イオンの輸送や代謝機構についてはほとんど明らかになっていない。

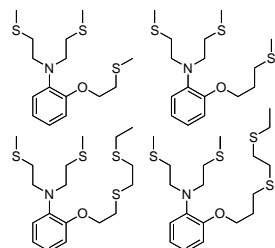
2. 研究の目的

細胞内における銅イオンは通常一価の状態が存在している。そのため、本研究では銅一価イオンに対して選択的な蛍光応答を示すセンサー分子の開発を目的とした。センサー分子の蛍光スイッチとして光誘起電子移動機構に着目し、電子ドナー部位が銅一価イオンと相互作用することで蛍光増大が起こるような分子を設計する。さらに、得られた蛍光センサーを用いて細胞内銅一価イオンの蛍光イメージングを行う。

3. 研究の方法

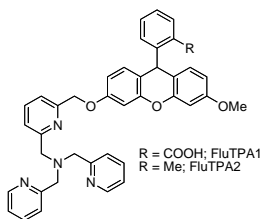
(1) 様々なチオエーテル配位子を含む銅一価錯体の物性評価

本研究では低原子価である銅一価を安定に捕捉するための配位部位として、リンカー長や配位ドナー数の異なる4種類のポリチオエーテル型配位子の合成を行った。これらの配位子と銅一価イオンを作用させ、対応する銅一価錯体を得た。得られたそれぞれの銅一価錯体については、X線結晶構造解析、酸化還元電位測定、温度可変NMR測定などを行い、配位構造が与える銅一価錯体の物性について系統的な検討を加えた。



(2) 還元型フルオレセイン骨格を利用した銅一価蛍光センサーの開発

光誘起電位移動型に加え、還元型フルオレセイン骨格を利用した銅一価蛍光センサーの開発に着手した。還元型フルオレセインとピリジルメチルアミン型の四座配位子をベンジルエーテル結合を介して連結した分子FluTPAsを合成した。細胞内環境を模倣するため、ミリMレベルのグルタチオンを含んだ緩衝液を調製し、金属イオンの選択性や反応性について検討した。

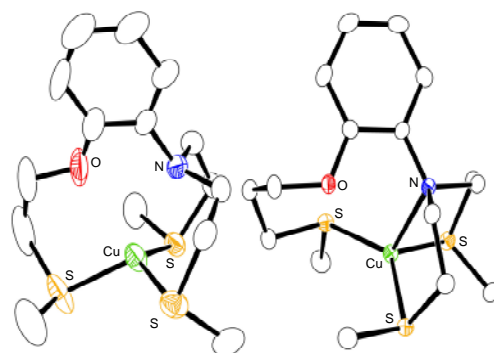


4. 研究成果

(1) 様々なチオエーテル配位子を含む銅一価錯体の物性評価

NMRや紫外可視吸収スペクトル測定から、

合成したチオエーテル配位子は全て銅一価イオンと1:1で錯形成することがわかった。また、X線結晶構造解析から銅イオンは歪んだ三角錐構造を有していたが、リンカーの長さによって銅中心の歪み度合いが異なっていることが示された。すなわち、5員環キレートのみで構成される銅錯体に比べ、6員環キレートを含むものでは配位子の自由度が高くなるため、四面体構造に近づいていることがわかった。さらに、温度可変¹H-NMRスペクトル測定から銅イオンと窒素原子の相互作用の強さや銅イオンの交換反応速度について検討したところ、リンカー長が長いほうは銅-窒素原子間の相互作用が弱くなっており、さらに銅イオンの交換反応速度は20倍程度遅くなっていることがわかった。一方、各銅錯体の酸化還元電位について検討したところ、6員環キレートを含むものでは酸化



還元波の可逆性が悪くなることがわかった。これは、6員環にすることで銅の一価状態と二価状態で大きな構造変化が誘起されることを示している。

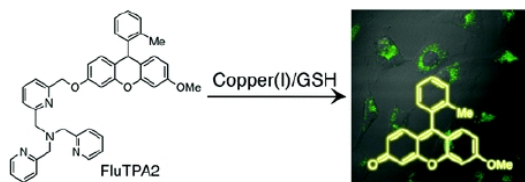
次に、得られたチオエーテル配位子と蛍光団を組み合わせた銅一価蛍光プローブの合成を行った。いずれの場合も銅一価イオンの添加により7倍程度の蛍光増大が認められたが、予想よりもはるかに低いものであった。フェムト秒レーザー分光光度計を用いて銅一価錯体の一重項励起状態の寿命を測定したところ、これらの錯体の蛍光消光は光誘起電子移動によるものであることがわかった。

(2) 還元型フルオレセイン骨格を利用した銅一価蛍光センサーの開発

還元型フルオレセインとピリジルメチルアミン型の四座配位子TPAの組み合わせた化合物FluTPAsを合成し、銅一価プローブとしての機能を評価した。まず、グルタチオンを含む緩衝溶液に銅一価または二価イオンを加え、これにFluTPAsを添加したところ、強い蛍光を発することがわかった。このような蛍光応答は銅イオンに選択的であり、アルカリおよびアルカリ土類金属イオン、生体金属イオンなどには全く反応しなかった。この結果は、FluTPAsが生理的条件下でも機能するプローブ分子であることを示している。銅イオンとの反応後の生成物の同定をHPLCや

ESI-MS を用いて行ったところ、蛍光体である酸化型フルオレセインと共に、TPA 配位子のベンジル位がアルデヒドまたはカルボン酸まで酸化されたものが確認された。またこの反応は嫌気性条件下で進行しなかったことから、ベンジルーエテル結合の開裂反応には分子状酸素由来の活性酸素種が生成していることが明らかとなった。すなわち、TPA 配位子で捕捉された銅一価イオンが分子状酸素と反応することで、銅-活性酸素種を生成し、これがベンジルーエテル結合の炭素-水素結合を活性化しているものと考えられる。

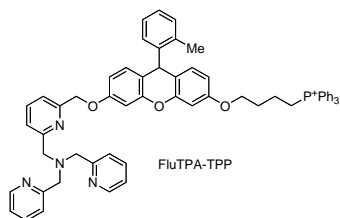
一方、FluTPA1 はカルボキシ基の高い水溶性のため細胞膜透過性は認められなかったが、より脂溶性の高い FluTPA2 は細胞膜透過性を有しており、細胞内銅イオンと反応して強い蛍光を発することがわかった。この結果は、試験管で観測された銅イオンによるベンジルーエテル結合の酸化的開裂反応が細胞



内でも同様に進行していることを示しており、FluTPA2 は細胞内銅イオンを検出するための有用なツール分子として機能することがわかった。

次に、プローブ分子が細胞内ミトコンドリアに局在化できるよう、カチオン性の官能基のプローブ分子内への導入を試みた。ホスホニウムイオン

を有する FluTPA-TPP を新規に合成し、その機能を評価した。蛍光イメージング



測定の結果、

FluTPA-TPP は目的どおりミトコンドリアに局在化しており、ミトコンドリア近傍の銅イオン検出、すなわち細胞内小器官の局所イメージングを達成することができた。

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 6 件)

- ① T. Ito, T. Hirayama, M. Taki, S. Iyoshi, S. Dai, S. Takeda, C. Kimura-Sakiyama, T. Oda, Y. Yamamoto, Y. Maéda, A. Narita, Electron microscopic visualization of the filament binding mode of actin binding proteins. *Journal of Molecular Biology*, **408**, 26-39 (2011), 査読有

- ② T. Ito, A. Narita, T. Hirayama, M. Taki, S. Iyoshi, Y. Yamamoto, Y. Maéda, T. Oda Human spire interacts with the barbed end of the actin filament. *Journal of Molecular Biology*, **408**, 18-25 (2011), 査読有
- ③ M. Taki, F. Asahi, T. Hirayama, Y. Yamamoto, Design and Synthesis of Fluorescent Probe for Polyhistidine Tag Using Macrocyclic Nickel(II) Complex and Fluorescein Conjugate. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, **84**, 386-394 (2011), 査読有
- ④ M. Taki, S. Iyoshi, A. Ojida, I. Hamachi, Y. Yamamoto, Development of Highly Sensitive Fluorescent Probes for Detection of Intracellular Copper(I) in Living Systems. *Journal of the American Chemical Society*, **132**, 5938-5939 (2010), 査読有
- ⑤ T. Hirayama, M. Taki, A. Kodan, H. Kato, Y. Yamamoto, Selective labeling of tag-fused protein by tryptophan-sensitized luminescence of a terbium complex. *Chemical Communications*, 3196-3198 (2009), 査読有
- ⑥ M. Taki, Y. Watanabe, Y. Yamamoto, Development of ratiometric fluorescent probe for zinc ion based on indole fluorophore. *Tetrahedron Letters*, **50**, 1345-1347 (2009), 査読有

[学会発表] (計 25 件)

- ① 水川友章・酒井尚子・多喜正泰・山本行男 TPA 型四座配位子を用いた銅-活性酸素錯体による C-H 結合活性化機構の解明 日本化学会第 91 春季年会, 日本化学会第 91 春季年会(2011)講演予稿集, 2011 年 3 月 11 日
- ② M. Taki, S. Iyoshi, Y. Yamamoto Development of a novel copper(I) fluorescent probe utilizing copper-dioxygen activation mechanism *Pacificchem2010*, Honolulu, USA, 2010 年 12 月 19 日
- ③ M. Taki, F. Asahi, Y. Yamamoto Design and Synthesis of Visible-Excitable Fluorescent Probe for Polyhistidine Tag Using Macrocyclic Nickel (II) Complex *The 5th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference*, Kaohsiung, Taiwan, 2010 年 11 月 2-5 日
- ④ M. Taki, S. Iyoshi, Y. Yamamoto Development of Copper(I)-selective Fluorescent Probes Based on a Reduced Form of Fluorescein *60th Anniversary Conference on Coordination Chemistry in OSAKA*, Osaka (大阪国際交流センター), Japan, 2010 年 9 月 28 日

- ⑤ 多喜正泰・山本行男
還元型フルオレセイン骨格を利用した新規銅一価蛍光センサーの開発
第 24 回生体機能関連化学シンポジウム,
九州大学, 2009 年 9 月 14 日
- ⑥ M. Taki, A. Ojida, I. Hamachi, Y. Yamamoto
Ratiometric Imaging of Cadmium Ion Using
A Novel Fluorescent Sensor Based on
7-Amino-4-methylcoumarin
*14th International Conference on Biological
Inorganic Chemistry*, Nagoya (名古屋国際会議場), Japan, 2009 年 7 月 25-30 日

[その他]

ホームページ

<http://www.users.iimc.kyoto-u.ac.jp/~z59219/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

多喜 正泰 (TAKI MASAYASU)

京都大学・地球環境学堂・助教

研究者番号 : 70378850