

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 7日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22550068

研究課題名（和文） 生体内金属イオン検出のための新規な蛍光共鳴エネルギー移動型化学センサーの開発

研究課題名（英文） Synthesis and metal ion-sensing properties of FRET-based fluorescent chemosensors

研究代表者

川上 淳 (KAWAKAMI JUN)

弘前大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：60261426

研究成果の概要（和文）：生体内で様々な重要な働きをしている金属イオンが「いつ」、「どこで」、「どのように」作用しているかを明らかにすることは生命科学の研究にとって非常に重要である。本研究では、2-アミノトリプタンスリンを蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）のエネルギーアクセプターとする種々の新規 FRET 型蛍光性化学センサーを合成し、FRET-on から FRET-off への変化による金属イオンの蛍光検出に成功した。

研究成果の概要（英文）：FRET is defined as an excited-state energy interaction between two fluorophores in which excited donor energy is transferred to an acceptor part without any photon-emission. In this study, some new FRET-based fluorescent chemosensors for metal ions were synthesized. For example, excited at 325 nm corresponding to the absorption of pyrene unit of 2-aminotryptanthrin-pyrene derivative (**T2NH-PnP**), emission at 600 nm from 2-aminotryptanthrin unit is observed, indicating that intramolecular FRET occurs in **T2NH-PnP** (FRET-on). However, when Hg^{2+} or Cu^{2+} is added to a solution of **T2NH-PnP**, the fluorescence of 2-aminotryptanthrin is dramatically quenched whereas that of pyrene is revived (FRET-off).

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
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・分析化学

キーワード：金属イオン、蛍光共鳴エネルギー移動、蛍光性化学センサー、2-アミノトリプタンスリン、超分子化学

1. 研究開始当初の背景

感度の良い蛍光を用いて特定の物質を検出する蛍光性化学センサーは、環境中や生体内の金属イオンや有機分子の簡便分析法として研究されてきた。例えば、米国ブリガム・ヤング大学の J. S. Bradshaw, R. M. Izatt 両教授の研究グループが 2001 年に報告した、 Zn^{2+} , Cd^{2+} 用蛍光性化学センサーの論文は、

権威あるアメリカ化学会の学術誌 *J. Org. Chem.* の表紙をかざり、環境中の金属イオンの簡便分析試薬としてメディアでも多数取り上げられた。また、生体内の金属イオンの検出では、カリフォルニア大学の 2008 年ノーベル化学賞受賞者 R.Y. Tsien 教授らが 1985 年に報告した Ca^{2+} 検出用蛍光プローブ Fura-2 が有名であり、現在も細胞内の Ca^{2+} の

検出で最もよく使われている。日本でも、東京大学大学院 長野哲雄 教授らにより開発された脳をはじめとする各種臓器の亜鉛イオンの働きを観察する Zn^{2+} 検出用蛍光プローブが、2002年に製品化され市販されている。このように、蛍光性化学センサーは用途の広がりを見せ重要性は非常に増しており、特に数年前より、「化学的観点から化学的手法を用いて生命現象を解明する」という新しい学問分野であるケミカルバイオロジーにおいても、金属イオンを含む生体物質の蛍光イメージングセンサーは、その中核をなす、最も重要な研究の一つとされている。本研究代表者は、平成7, 11~12, 14~15, 17~18年度の科学研究費補助金等により、一貫して蛍光性化学センサーに関する研究を行っており、平成13年には、文部科学省在外研究員として、前述の米国ブリガム・ヤング大学の J. S. Bradshaw, R. M. Izatt 両教授の研究グループの一員として1年間 8-ヒドロキシキノリンを用いた Zn^{2+} 用蛍光性化学センサーの開発研究に従事した。また、平成20~21年度には、弘前大学大学院理工学研究科長指定重点研究として、植物の藍から抽出されるトリプタンスリン(図1)の種々の誘導体を合成し、本学大学院医学研究科との学内共同研究で、トリプタンスリン類の抗菌活性や細胞分化促進能について検討する過程で、先に述べたトリプタンスリン類の優れた吸収・発光特性を見出し、本研究を立案するに至った。

2. 研究の目的

生体内で様々な重要な働きをしている生体内金属イオンが「いつ」、「どこで」、「どのように」作用しているかを明らかにすることは生命科学の研究にとって非常に重要である。その最も有力な手段として、蛍光性化学センサー(蛍光イメージングプローブ)がある。本研究代表者は、植物の藍から抽出される抗菌剤のトリプタンスリンが、低分子でありながら可視領域に吸収・発光バンドを持ち、2-位にアミノ基を導入した2-アミノトリプタンスリン(図2)が強い蛍光($\Phi_f = 0.48$ in MeCN)を示し、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)の優れたアクセプター分子になることを見出した(特許出願中:特願2009-96311, 特開2010-248086)。

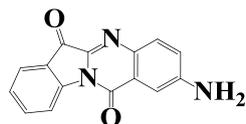


図1 2-アミノトリプタンスリン

蛍光共鳴エネルギー移動 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) とは、励起エネルギーが、分子内のエネルギードナー (D)

からエネルギーアクセプター (A) に移動することによって、Dを励起するとAの蛍光が観測される現象のことである(図2a)。

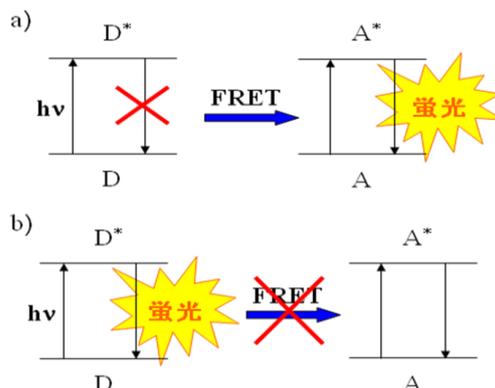


図2 蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET)

しかし、特定の金属イオンとの相互作用により FRET が起こらないようにすることができれば、波長の異なる D の蛍光が観測されることになり(図2b)、金属イオンの蛍光検出が可能となる。また逆に、金属イオンとの相互作用により、FRET が起こらない系を FRET が起こるようにするのもよい。そこで本研究では、トリプタンスリン誘導体を中心とした種々の新規な FRET 型蛍光性化学センサーを合成し、生体内における必須金属イオン及び有毒金属イオンの検出について検討する。

3. 研究の方法

本研究では、図3に示したような2-アミノトリプタンスリンを FRET のエネルギーアクセプターとする種々の FRET 型蛍光性化学センサーを分子設計し、以下に示す(1)~(4)の手順に従い研究を行った。

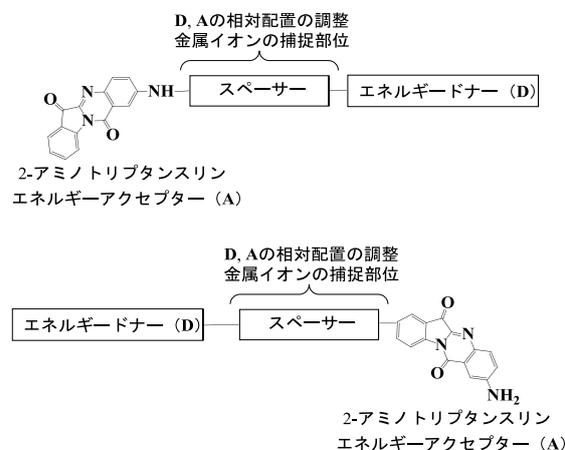


図3 FRET 型蛍光性化学センサー

- (1) FRET 型蛍光性化学センサーの合成。
- (2) 紫外・可視吸収スペクトル及び蛍光スペクトルの測定。
- (3) 金属イオン存在下での紫外・可視吸収スペクトル及び蛍光スペクトルの測定。
- (4) NMR, LC-MS 等により分子構造についての検討。また、理論計算により発光・消光のメカニズムについての検討。

4. 研究成果

(1) 2-アミノトリプタンスリン

最初に、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 型蛍光性化学センサーのエネルギーアクセプターとなる 2-アミノトリプタンスリンの蛍光特性について詳細に調べた。その結果、強い蛍光を示すだけでなく、溶媒極性によって蛍光波長が大きく変化する、優れた正の蛍光ソルバトクロミズムを示すことがわかった (図 4, 雑誌論文 1)。

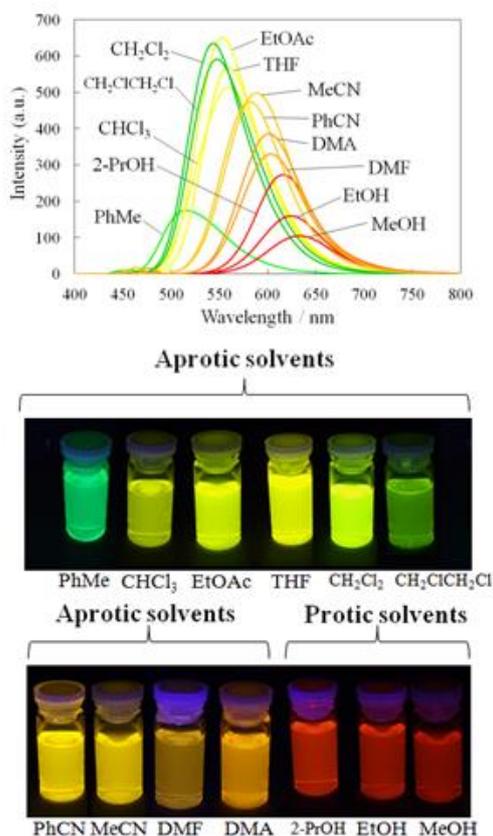


図 4 2-アミノトリプタンスリンの各種溶媒中での蛍光スペクトル (上) と蛍光発光の様子 (下)

環境 (分子周辺の極性変化) によって蛍光波長が変化する蛍光ソルバトクロミック色素は、特定の生体反応とシグナル変化の相関が抽出しやすく、レシオメトリー測定により高い定量性が期待できる。また、2-アミノトリ

プタンスリンの様な小分子の有機蛍光色素は、測定対象の生体反応を阻害することもないため、抗原抗体反応や、DNA のインターカレート等の極性変化を伴う系に対し、優れた蛍光プローブとなることが示唆された。更に、2-アミノトリプタンスリンは高い抗菌活性を有することから (雑誌論文 2, 3)、抗菌性有機蛍光色素としての利用も今後期待できる。

(2) 2-アミノトリプタンスリン誘導体による金属イオン用 FRET 型蛍光性化学センサー

ピレンを FRET のエネルギードナー (D)、2-アミノトリプタンスリンをエネルギーアクセプター (A) とし、D, A を長さの異なる種々のポリエーテル鎖でつないだ系 **T2NH-PnP** ($n = 1, 2, 3, 4, 6$) を合成し、分子内 FRET と FRET の on, off を利用した金属イオン用蛍光生化学センサーとしての性質について検討した (図 5)。

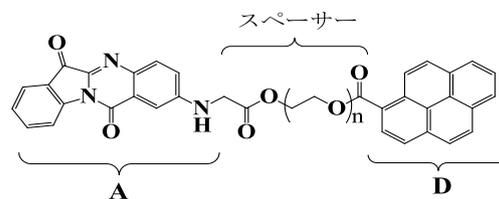


図 5 **T2NH-PnP** ($n = 1, 2, 3, 4, 5, 6$)

T2NH-PnP の基準物質となる 1-ピレンカルボン酸エチルと 2-アミノトリプタンスリン酢酸エチルの種々の濃度に調製した 1:1 混合溶液では、濃度を高くすることで分子間 FRET が起こることがわかった。しかし、効率の良い分子間 FRET を起こすためには非常に高濃度にしなければならないため、濃度消光により蛍光強度は著しく低下してしまう。そのため、十分な蛍光強度を保ったまま FRET を起こすためには、分子間 FRET よりも分子内 FRET の方が有利であると言える。

T2NH-PnP ($n = 1, 2, 3, 4, 5, 6$) の分子内 FRET に及ぼすスペーサーの長さの影響についてであるが、アセトニトル中での FRET 効率の高さは n が $2 \gg 1 > 3 > 4 > 5, 6$ の順であり、 $n = 1$ と $n = 2$ で順番が逆転している以外は、スペーサーの長さが短くなるにつれて FRET 効率が上昇することが明らかとなった。 $n = 2$ は D の蛍光に対する A の蛍光の割合 ($\Phi_{f,A}/\Phi_{f,D}$) が非常に大きく **T2NH-PnP** の中で最も分子内 FRET に適した D, A の配向をとることができるものと考えられる。一方、 $n = 1$ ではスペーサーが短すぎるために、D, A が $n = 2$ のような FRET に適した配向は取りづらいものと考えられる。また、**T2NH-P6P** の溶媒効果の実験から、プロトン性溶媒中におい

では、FRET 効率が低下することも明らかとなった。

T2NH-PnP ($n = 1, 2, 3, 4, 5, 6$) の金属イオンセンシングに対するスペーサーの影響を、14種類の金属イオンを①～④の4つのグループに分類して検討した。その結果、① Hg^{2+} , Al^{3+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} と② Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} では、金属イオン添加により FRET-on から FRET-off の挙動を示し、特に Hg^{2+} と Cu^{2+} で顕著な変化が観測された (図 6)。

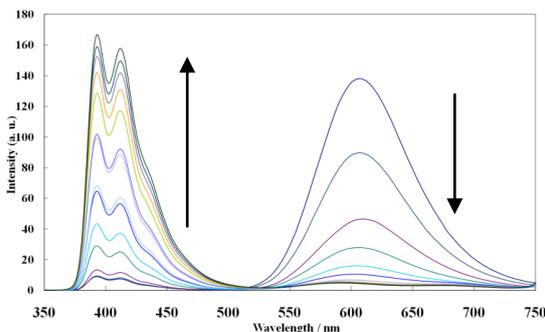


図 6 **T2NH-P5P** に Hg^{2+} を添加した際の FRET-on から FRET-off への蛍光スペクトル変化

①と②の金属イオンは、アミノ基の付近で捕捉され、皆類似の挙動を示したが、スペーサーの長さが短い場合は **D** と **A** の衝突する確率が上がるためか、FRET-off の際の **D** の蛍光がスペーサーの長いものに比べて消光される傾向にあることがわかった。③ Ba^{2+} , Ca^{2+} , Pb^{2+} では、スペーサーの長い **T2NH-P5P** 等では金属イオンをポリエーテル鎖の部分で捕捉し疑似環状構造をとり 420 nm 付近に分子内エキサイプレックス蛍光を示すが、スペーサーの短い **T2NH-P2P** 等では金属イオンを捕捉できないために 420 nm 付近の蛍光も観測されず、スペーサーの長さの影響が明確に観測された。④ Mg^{2+} , Ag^{+} , Co^{2+} , Zn^{2+} に対しては、**T2NH-PnP** は金属イオンを捕捉せず、大きな蛍光変化は観測されなかった。

次に、ウンベリフェロン (7-ヒドロキシマリニン) を FRET のエネルギードナー (**D**)、2-アミノトリプタンスリンをエネルギーアクセプター (**A**) とし、**D**, **A** をペンタエチレングリコールでつないだ系 **T2NH-P5UF** の結果について記す (図 7)。

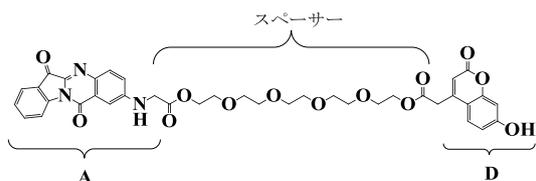


図 7 **T2NH-P5UF**

A よりも **D** のモル光係数が大きい 325 nm で励起した濃度 1×10^{-5} mol/L に調製した **T2NH-P5UF** とその基準物質となる 7-ヒドロキシマリニン酢酸エチルと 2-アミノトリプタンスリン酢酸エチルの 1:1 混合物の蛍光スペクトルを比べると、基準物質の 1:1 混合物に対し、**T2NH-P5UF** では **D** 由来の蛍光の消光と **A** 由来の蛍光の著しい増大が観測され、効率よく分子内 FRET が起こることが明らかとなった。また、水と極性の異なる 8 種類の有機溶媒を用いて溶媒効果を調べたところ、水を除くすべての有機溶媒中で分子内 FRET による **A** 由来の黄緑色から赤色の蛍光を示したのに対し、水中では **A** 由来の蛍光は観測されず、**D** のウンベリフェロンのアニオン形由来の青色発光が観測された。以上の結果から、**T2NH-P5UF** は青色から赤色迄の可視光全般を発光する優れた有機蛍光ゾルバトクロミック色素であることが分かった。

2NH-P5UF のアセトニトリル中での FRET の on, off による金属イオンの蛍光センシングについて 14 種類の金属の各過塩素酸塩の添加実験により検討した。その結果、挙動の違いにより、① Al^{3+} , Hg^{2+} , ② Fe^{2+} , Fe^{3+} , ③ Cu^{2+} , ④ Ba^{2+} , Ca^{2+} , ⑤ Pb^{2+} , ⑥ Ag^{+} , Mg^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} の 6 グループに分類できることがわかった。金属塩添加により FRET の on から off の変化が観測されたのは、①～③であり、特に① Al^{3+} , Hg^{2+} では **A** 由来の蛍光の減少と、**D** 由来の蛍光の増大が顕著であった (図 8)。

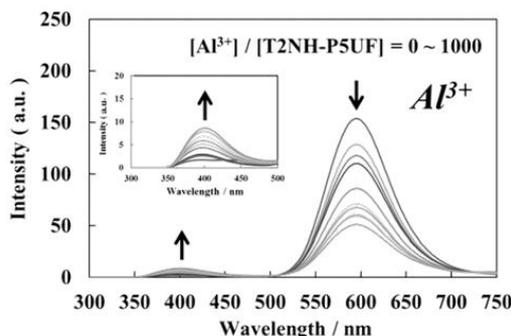
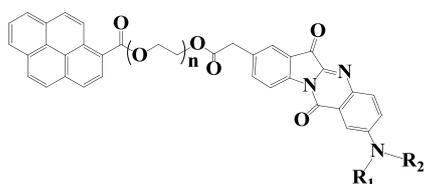


図 8 **T2NH-P5UF** に Al^{3+} を添加した際の FRET-on から FRET-off への蛍光スペクトル変化 (挿入図は短波長側の拡大図)

金属イオンの捕捉部位について Al^{3+} の場合を調べたところ、**A** の基準物質の 7-ヒドロキシマリニン酢酸エチルが Al^{3+} の添加に対し **T2NH-P5UF** と類似の吸収蛍光挙動を示すことや、 ^1H NMR 測定において Al^{3+} の添加によりアミノ基のピークが消失することなどから、 $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{COO}-$ 部分であることが推察さ

れた。④Ba²⁺, Ca²⁺ では金属イオン濃度の上昇に従って **A** 由来の蛍光強度の上昇が観測された。これは、ポリエーテル鎖で金属イオンを捕捉することで疑似環状構造を形成し、**D**と**A**の距離が近接することでFRET 効率が高くなったためと考えられる。また⑤Pb²⁺ では**A**の僅かな蛍光消光のみが、⑥Ag⁺, Mg²⁺では金属イオンの捕捉は認められず、金属イオンとの衝突による熱的失活と思われる不規則な僅かな蛍光消光が観測された。

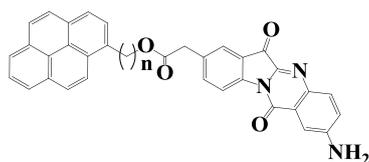
次は、前述のトリプタンスリンの2位のアミノ基にスペーサーを導入した系ではなく、8位にスペーサーを導入し、FRETの**D**としてピレンを用いた種々の系についての結果を示す(図9)。



T2NH₂-8-PnP (R₁ = R₂ = H, n = 1, 3, 5)

T2NHCH₂COOEt-8-P5P (R₁ = CH₂COOEt, R₂ = H, n = 5)

T2N(CH₂COOEt)₂-8-P5P (R₁ = R₂ = CH₂COOEt, n = 5)



T2NH₂-8-CnP (n = 1, 4)

図9 トリプタンスリンの8位にスペーサーを導入した種々の系

FRETの**D**となるピレンを選択的に励起した場合、**T2NH₂-8-PnP** (n = 1, 3, 5), **T2NHCH₂COOEt-8-P5P**, **T2N(CH₂COOEt)₂-8-P5P**ではいずれも**D**の著しい蛍光消光と**A**の2-アミノトリプタンスリンの蛍光増大が観測され、分子内FRETが示された。しかし、嵩高い酢酸エチル基を2つ導入した**T2N(CH₂COOEt)₂-8-P5P**では最もFRETの効率が悪く、FRETが起こる際に**D**, **A**の配向が重要であることがわかった。また、**T2NH₂-8-P5P**を用いて溶媒効果を調べたところ、極性の異なる7種類の有機溶媒中でいずれも分子内FRETが観測され、溶媒極性の増大に伴い**A**の蛍光極大波長がレッドシフトすることや、プロトン性溶媒中では、非プロトン性溶媒中にくらべて**A**の蛍光強度が低下すること等がわかった。一方、**T2NH₂-8-CnP** (n = 1, 4)では、**D**の蛍光消光に伴う**A**の蛍光増大が観測されなかった。そこで、CV(サイクリックボルタメトリー)測定から得られた酸化還元電位を用いて電子移動の

自由エネルギー変化を調べたところ、**D**の蛍光消光はPET(光誘起電子移動)消光による可能性が高いことがわかった。

金属イオンの蛍光センシングについては、例えば**T2NH₂-8-P5P**では、蛍光挙動から金属イオンの種類によって、①Ag⁺, Cd²⁺, Co²⁺, Fe²⁺, Mg²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺, ②Ba²⁺, Ca²⁺, Pb²⁺, ③Al³⁺, Cu²⁺, Fe³⁺, Hg²⁺の3グループに分類できることができ、①では蛍光変化は殆ど認められず、②では僅かな**A**の蛍光の消光と425 nm近辺の新しい蛍光帯が観測された。一方③では、著し**A**の蛍光消光が観測されたが、予想に反し**D**の蛍光増大は観測されず、FRET-onからFRET-offへの明確な変化は見られなかった。③で、**D**の蛍光増大が観測されない理由は、金属イオン捕捉に伴い、**A**由来の長波長側の吸収帯のモル吸光係数は減少するものの、**D**の蛍光との重なりはあり、**D**のピレンから金属イオンを捕捉した2-アミノトリプタンスリン部位へのFRETが依然起きていることが予想された。

以上のように、本研究では2-アミノトリプタンスリンをFRETの**A**とする種々の金属イオン用FRET型蛍光性化学センサーの合成に成功し、幾つかの重要な知見を得ることができた。

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7件)

1. J. Kawakami, H. Kawaguchi, K. Kikuchi, A. Yamaya, S. Ito and H. Kitahara, Fluorescent Solvatochromism of 2-Aminotryptanthrin, *Trans. Mater. Res. Soc. Japan*, **38**, 123-125 (2013). (査読有り)
2. J. Kawakami, H. Kakinami, N. Matsushima, A. Nakane, H. Kitahara, M. Nagaki, and S. Ito, Structure-activity Relationship Analysis for Antimicrobial Activities of Tryptanthrin Derivatives Using Quantum Chemical Calculations, *J. Comput. Chem. Jpn*, **12**, (2013), DOI: 10.2477/jccj.2012-0026. (査読有り)
3. J. Kawakami, N. Matsushima, Y. Ogawa, H. Kakinami, A. Nakane, H. Kitahara, M. Nagaki, and S. Ito, Antibacterial and Antifungal Activities of Tryptanthrin Derivatives, *Trans. Mater. Res. Soc. Japan*, **36**, 603-606 (2011). (査読有り)
4. J. Kawakami, Y. Miyamoto, T. Isobe, M. Nagaki, and S. Ito, Poly(amide amine) Dendrimers with Naphthyl Units as Fluorescent Chemosensor Materials for Metal Cations, *Trans. Mater. Res. Soc. Japan*,

35, 849-852 (2010). (査読有り)

[学会発表] (計 15 件)

1. 築城彰洋, 下坪拓也, 川口博子, 鈴木啓太, 川上 淳, 伊東俊司, 新規トリプタンズリン誘導体の合成, 平成 24 年度化学系学協会東北大会, 2012 年 9 月 15 日 (秋田).
2. 邊見世統, 成田信夫, 川上 淳, 伊東俊司, 7-置換クマリン-2-アミノトリプタンズリン誘導体の分子内蛍光共鳴エネルギー移動, 平成 24 年度化学系学協会東北大会, 2012 年 9 月 15 日 (秋田).
3. 原田裕貴, 菊地 陽, 川上 淳, 伊東俊司, ピレン-2-アミノトリプタンズリン誘導体の分子内蛍光共鳴エネルギー移動, 平成 24 年度化学系学協会東北大会, 2012 年 9 月 15 日 (秋田).
4. 菊地 陽, 原田裕貴, 川上 淳, 伊東俊司, ピレン-2-アミノトリプタンズリン誘導体による金属イオン用 FRET 型蛍光性化学センサー, 2012 年光化学討論会, 2012 年 9 月 13 日 (東京).
5. 成田信夫, 邊見世統, 川上 淳, 伊東俊司, 7-置換クマリン-2-アミノトリプタンズリン誘導体による金属イオン用 FRET 型蛍光性化学センサー, 2012 年光化学討論会, 2012 年 9 月 13 日 (東京).
6. 川上 淳, 前 雅隆, 菊地 陽, 成田信夫, 伊東俊司, 2-アミノトリプタンズリン誘導体による金属イオン用 FRET 型蛍光性化学センサー, 日本化学会第 92 春季年会, 2012 年 3 月 26 日 (横浜).
7. 成田信夫, 川上 淳, 伊東俊司, ウンベリフェロン-2-アミノトリプタンズリン誘導体による金属イオン用 FRET 型蛍光性化学センサー, 平成 23 年度化学系学協会東北大会, 2011 年 9 月 17 日 (仙台).
8. 菊地 陽, 相馬有沙, 川上 淳, 伊東俊司, ピレン-2-アミノトリプタンズリン誘導体による金属イオン用 FRET 型蛍光性化学センサー, 平成 23 年度化学系学協会東北大会, 2011 年 9 月 17 日 (仙台).
9. 前 雅隆, 川上 淳, 伊東俊司, ピレン-2-アミノ-8-トリプタンズリニル酢酸誘導体による金属イオン用 FRET 型蛍光性化学センサー, 平成 23 年度化学系学協会東北大会, 2011 年 9 月 17 日 (仙台).
10. 前 雅隆, 川上 淳, 菊地健太, 相馬有沙, 伊東俊司, 2-アミノトリプタンズリン-ピレン誘導体による金属イオン用 FRET 型蛍光性化学センサー, 日本化学会第 91 春季年会, 2011 年 3 月 28 日 (横浜).
11. 川上 淳, 蛍光性化学センサーの開発研究, 日本分析化学会東北支部青森地区講演会「分析化学と化学分析の青森フォーラム」, 2010 年 11 月 9 日 (弘前).
12. 川上 淳, 菊地健太, 前 雅隆, 相馬有沙,

成田信夫, 伊東俊司, トリプタンズリン誘導体による FRET 型金属イオン用蛍光センサー, 平成 22 年度化学系学協会東北大会, 2010 年 9 月 25 日 (盛岡).

13. 荒川優太, 川上 淳, 伊東俊司, ウンベリフェロン誘導体による金属イオン用蛍光プローブの合成, 平成 22 年度化学系学協会東北大会, 2010 年 9 月 25 日 (盛岡).
14. 前 雅隆, 川上 淳, 伊東俊司, 2-位及び 8-位置換トリプタンズリン誘導体の合成, 平成 22 年度化学系学協会東北大会, 2010 年 9 月 25 日 (盛岡).
15. 川上 淳, 菊地健太, 前 雅隆, 相馬有沙, 成田信夫, 伊東俊司, トリプタンズリン誘導体による FRET 型金属イオン用蛍光センサー, 日本分析化学会第 59 年会, 2010 年 9 月 17 日 (仙台).

[その他]

ホームページ等

弘前大学大学院理工学研究科川上研究室ホームページ (<http://www.st.hirosaki-u.ac.jp/~jun/jklab/jklab001.html>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川上 淳 (KAWAKAMI JUN)

弘前大学・大学院理工学研究科・准教授
研究者番号：60261426