

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：34414

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790029

研究課題名(和文) ON/OFF制御可能な新規蛍光化合物の合成、並びに蛍光プローブへの応用

研究課題名(英文) Synthesis of novel fluorescent compounds possessing a ON/OFF switching system, and their application to fluorescent probes

研究代表者

池尻 昌宏 (Ikejiri, Masahiro)

大阪大谷大学・薬学部・准教授

研究者番号：00412396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：蛍光タンパク質の発色団をモデルとした新規蛍光低分子(ジアリールメチレンイミダゾリノン類、通称DAIN類)の開発研究において、主に以下の成果を得た。

1)ジアリール部に修飾を施した4種のDAINの合成に成功した。2)DNAの塩基配列認識能を示すDAINの開発を目的に、DAIN骨格に側鎖を介してアジド基を有する2種のDAINの合成に成功した。3)カリウムイオン認識能を有するDAINの合成に成功した。4)膜流動性プローブの開発を目指し、コレステレンとDAINとのハイブリッド体の合成に成功した。

研究成果の概要(英文)：I obtained the following results in the research on the development of a novel fluorescent small molecule, namely, diarylmethyleneimidazolinone (DAIN) that mimics a green fluorescent protein chromophore.

1) Four DAIN analogs having different diaryl moieties were synthesized. 2) Two DAIN analogs equipping a side chain containing an azide group at the end were synthesized, aiming to the development of a DNA probe that can recognize the DNA sequence. 3) A potassium ion probe of DAIN was synthesized. 4) A cholesterol-hybrid DAIN analog was synthesized, aiming to the application to a probe for the membrane fluidity.

研究分野：有機化学

キーワード：蛍光分子 複素環 緑色蛍光タンパク質 イミダゾリノン コレステロール

1. 研究開始当初の背景

生命現象をリアルタイムに観測する。これは今日の医学・薬学研究における極めて有用な方法であり、その発展は目覚ましい。そしてその一手段として、蛍光物質をプローブ(検出試薬)に用いた分子イメージングがある。これは、生体分子の挙動を蛍光・視覚的に観察する手段として今日では必要不可欠なものであり、今後もその需要は増加すると思われる。この蛍光プローブを設計する上でポイントとなるのが、必要な状況で蛍光 ON となり、そうではない時に OFF となること。即ち、スイッチ ON/OFF の制御が重要となる。この性質を利用することで、目的物のみを選択的に可視化することが可能となる。

これまでもこのスイッチ機能を生み出す原理として、光誘起電子移動や蛍光共鳴エネルギー移動等が知られており、それらを利用した多くの蛍光プローブが開発されている。しかしながら、様々な環境下での蛍光プローブの使用を想定した場合、他のスイッチ機能の開発も当然必要になると思われる。そこで申請者は、これらと別のスイッチ機能の開発を目指し、緑色蛍光タンパク質(GFP)に注目した。GFPは蛍光標識タンパク質として、分子生物学等の分野で頻りに利用されている物質であり、GFP研究に対するノーベル賞受賞も記憶に新しい。実はこのGFPの高次構造には興味深い性質が埋め込まれており、そこにスイッチ機能のヒントを見つけた。つまり、GFPの蛍光発色団部位(クロモファー)は、 β -バレルと呼ばれるGFP特有の筒状三次構造の中では蛍光を発するが(スイッチ ON)、 β -バレルから抜き出すと、つまりクロモファー部位だけでは蛍光を発しなくなる(スイッチ OFF)。この性質には、タンパク質中でのアミノ酸残基との相互作用によるコンホメーションの固定化が重要な鍵となっており、クロモファー構造単体ではその固定化がなくなるため、結合の回転・異性化等のエネルギー消費が生じ無蛍光となる。つまりコンホメーションの固定化がスイッチのON/OFFを担う。意外なことに、GFP自体を用いる研究は世界中で盛んに行われているにも関わらず、このGFPクロモファーの持つコンホメーション固定による蛍光のON/OFFを活用した低分子蛍光プローブの研究例は殆ど報告されていなかった。

以上の背景の下、申請者は、このON/OFF機能の活用を目指し、GFPクロモファー模倣低分子アナログとしてジフェニルメチレン化イミダゾリノン(DPINと略)構造を考案・設計し、その合成・応用研究に取り組んでいた。特にその成果として本研究開始前に次の(1)~(3)の知見を得ていた。

(1) DPIN骨格の新規構築法の開発

(2) DPIN類(第一世代型)のユニークな蛍光活性

(3) DPIN類のON/OFF機能を活用したDNAプローブの開発

上記(1)~(3)に関しては、Organic Letters誌(2012, 14, 4406-4409)に詳細を報告している。

2. 研究の目的

本研究では、上記1.(1)~(3)に示したこれまでの成果のさらなる発展・応用を目的とした。特に、次の4点の課題について取り組むこととした。

(1) 第2世代DPIN類(DAIN類)の合成

これまでのDPIN類は目的の蛍光を発するものの、その強度には改善の余地があった。また励起波長に関しても、生体成分への照射を考慮するとエネルギーの低い長波長のものが望ましい。そこで、DPINの蛍光強度の向上、及び励起・蛍光波長の長波長シフト化を目的に、ジフェニルメチレン部を修飾した第2世代DPIN類、即ち、ジアリールメチレンイミダゾリノン類(通称DAIN類)を設計し、その合成を行う。

(2) 塩基配列認識能(スイッチON機能)を有するDNAプローブの合成

先の知見から、あるDPIN類はDNA検出能を有することが分かっており、またそのDNAへの挿入は比較的遅いことが示唆された。そこでその性質を利用すれば、塩基配列特異的な認識が可能と考えられた。即ち、オリゴヌクレオチドと連結したDAIN類を用いることで、相補鎖DNAとの二重鎖形成後のインターカレーションが、非特異的なインターカレーションよりも優先すると予想され、その場合、配列特異的な蛍光が可能となる。以上の構想の下、側鎖を介してオリゴヌクレオチドと連結した配列認識DAIN類を合成し、その認識能を評価する。

(3) 金属イオンの配位によるスイッチON機能を有するDAIN類の合成(陽イオン認識プローブ)

金属陽イオンの配位を利用したDAIN2分子の接近(分子間力)によるコンホメーション固定を想定し、エチレングリコール鎖で連結されたDAIN2分子アナログを合成し、その陽イオン認識能を評価する。

(4) 膜流動性(粘性)によるスイッチON機能を有するDAIN類の合成(膜流動性プローブ)

脂質二重膜への挿入によるコンホメーシ

オン固定を想定し、高い脂溶性構造を有する DAIN を合成し、その膜流動性プローブとしての認識能を評価する。

3. 研究の方法

上記 2.(1)~(4)については、以下の方法を用いて研究を行った。

(1)ジフェニル構造の修飾として、下記のジアリール構造を検討した(図1)。またその合成方法としては、申請者らの見出した DPIN 骨格の新規構築反応を適用した(図2)。

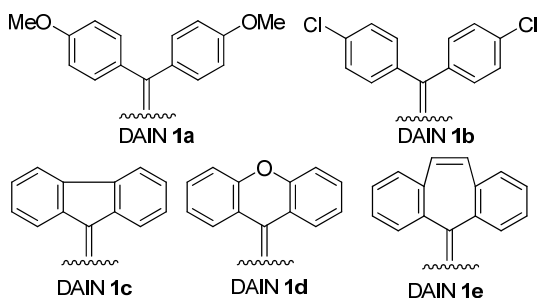


図1

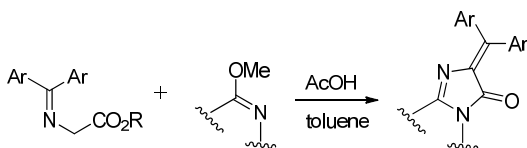


図2

(2)オリゴヌクレオチドと DAIN との連結にはアジドアルキンのクリック反応を利用することとした。また、発色団となる DAIN には、種々の知見を考慮して、ナフチル骨格型 DAIN 1f を採用した(図3)。側鎖には末端にアジド基を有するトリ、またはペンタエチレングリコールを用い、光延反応による DAIN との連結を検討した。なお、オリゴヌクレオチドとの連結、ならびに蛍光能の評価は共同研究先に依頼することとした。

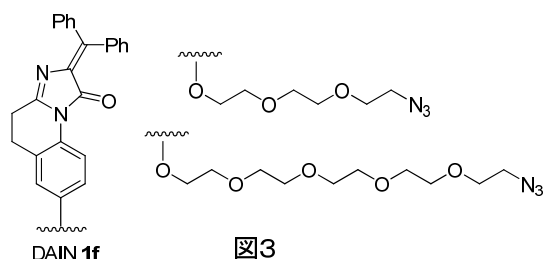


図3

(3) K⁺イオンの捕獲を目標に、18C6 クラウンエーテルと DAIN 1f 2分子とのハイブリッドアナログを合成し、その K⁺イオンの添加による蛍光能の変化について観察・考察した。なお、側鎖との連結には光延反応を採用した(図4)。

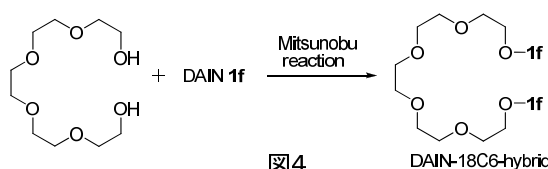


図4

DAIN-18C6-hybrid

(4)当初の予定では、脂溶性構造部位にグリセリン脂質を用いる計画であったが、これまでの合成研究の知見から、その合成は困難と予想された。そこで代案として、脂質部位にコレステレン骨格を用いて、DAIN とのハイブリッドアナログの合成を検討した。また、その溶媒粘性(流動性)による蛍光強度の変化を観察した。なお、ジアリール部位に関しては、ジフェニル構造を採用し、またコレステレン骨格との連結に関しては、コレステレンからベックマン転位により得られるアミド構造を足がかりとして DAIN 骨格構築反応を用いた(図5)。

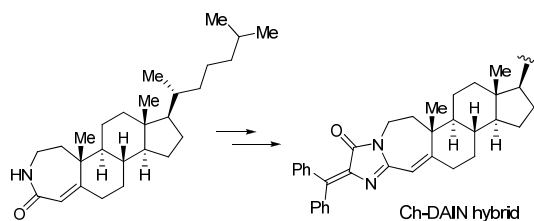


図5

Ch-DAIN hybrid

4. 研究成果

(1) 第2世代 DPIN 類(DAIN 類)の合成

上記 3.(1)の方法に従い、各種 DAIN の合成を検討した結果、1a~d に関しては合成に成功したが、1e については目的物を得ることはできなかった。また、1a~d について粉末状態での蛍光活性を評価した結果、1a に関しては、対応する DPIN よりも蛍光波長の長波長化が観測され、一方、1b においては短波長化が観測された。蛍光強度に関しては 1a, b 共に DPIN よりも低下した。1c, 1d に関しては、予想に反し、蛍光がほとんど観測されなかった。溶液状態の蛍光に関しては、DPIN と同様に 1a~d いずれもほとんど示さなかった。

粉末状態での蛍光特性においては、X線結晶構造解析の結果から、パッキング状態の様式によって - スタッキングの有無の違いがみられ、それが1つの要因として関与していることが示唆された。

なお、これらの合成ならびに蛍光特性の詳細については、Tetrahedron 誌に掲載予定となっている。また、上記 1a~e 他に、ジナフチル型の DAIN についても研究を進めている。

(2) 塩基配列認識能 (スイッチ ON 機能) を有する DNA プロープの合成

図3に示す2種の DAIN 1f 誘導体の合成は、光延反応を用いることで成功した。得られたアジト体に対して、モデル実験として低分子アルキンとのクリック反応を試みたところ、DAIN 骨格を維持したまま首尾よく反応は進行した。現在は共同研究先にて更なる研究を進めている。

(3) 金属イオンの配位によるスイッチ ON 機能を有する DAIN 類の合成 (陽イオン認識プロープ)

図4に示す DAIN-18C6-hybrid 体の合成について光延反応の検討を行った結果、1工程での合成は困難であったが、2工程に分割し、かつそれぞれ異なった光延試薬を用いることで合成に成功した。

得られた hybrid 体について、金属陽イオンの添加による蛍光強度の変化を観察した結果、目視では判断できない弱い蛍光であったが、予想通りカリウムイオン添加の際に蛍光強度の増加がみられた。本研究については、別のジアーリアル構造を持つ DAIN による検討を進めている。

(4) 膜流動性 (粘性) によるスイッチ ON 機能を有する DAIN 類の合成 (膜流動性プロープ)

図5に示すアミド体の合成は、コレステロンオキシムからのベックマン転位にて合成した。その後のイミデートへの変換、および DPIN 骨格構築反応も進行し、目的の Ch-DAIN hybrid の合成に成功した。

次に、Ch-DAIN hybrid の蛍光特性を評価した結果、予想通り、脂溶性溶媒の粘性 (流動性) による蛍光強度の増加がみられ、溶液状態でも目視可能な蛍光が観測された。また、リポタンパクを模倣した系においては、コレステロールの増加とともに蛍光が増加する興味深い知見を得た。

本研究については、日本薬学会第135年会にてその詳細を発表している。

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1件)

Masahiro Ikejiri, Kousuke Matsumoto, Hiraku Hasegawa, Daisuke Yamaguchi, Moe Tsuchino, Yoshiko Chihara, Takao Yamaguchi, Kazuto Mori, Takeshi Imanishi, Satoshi Obika, Kazuyuki

Miyashita.

Synthesis and fluorescence properties of 4-diarylmethylene analogues of the green fluorescent protein chromophore.

Tetrahedron in press (査読有)

doi:10.1016/j.tet.2015.05.073

[学会発表](計4件)

池尻 昌宏、森 謙太、宮城 里奈、千原 佳子、宮下 和之

コレステレンハイブリッド型 DAIN アナログの合成とその蛍光プロープ活性

日本薬学会第135年会

2015年3月27日

デザイン・クリエイティブセンター神戸 (兵庫県神戸市)

池尻 昌宏、山口 大輔、長谷川 啓、松本 公佑、千原 佳子、山口 卓男、今西 武、小比賀 聡、宮下 和之

緑色蛍光タンパク質の発色団モデル化合物の合成とその蛍光特性の評価

第39回反応と合成の進歩シンポジウム

2013年11月6日

九州大学医学部百年講堂 (福岡県福岡市)

池尻 昌宏、長谷川 啓、松本 公佑、土野 萌絵、千原 佳子、山口 卓男、今西 武、小比賀 聡、宮下 和之

緑色蛍光タンパク質の発色団をモデルにした蛍光低分子化合物の開発

第19回天然薬物の開発と応用シンポジウム

2012年11月1日

大阪大学会館 (大阪府豊中市)

池尻 昌宏、長谷川 啓、松本 公佑、土野 萌絵、千原 佳子、山口 卓男、今西 武、小比賀 聡、宮下 和之

GFP クロモファー類縁体の設計とその新規合成法の開発

第42回複素環化学討論会

2012年10月13日

京都テルサ (京都府京都市)

[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]

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池尻 昌宏 (Ikejiri, Masahiro)

大阪大谷大学・薬学部・准教授

研究者番号: 00412396

(2) 研究協力者

宮下 和之 (Miyashita, Kazuyuki)

小比賀 聡 (Obika, Satoshi)