

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25410137

研究課題名(和文) 新規な生体用近赤外蛍光プローブの開発

研究課題名(英文) Design and Synthesis of Near-infrared Fluorescent Probes for Bioimaging

研究代表者

川上 淳(KAWAKAMI, JUN)

弘前大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：60261426

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：生体物質の挙動を調べる有力な手段となる蛍光イメージングプローブ法では、600 nm 以下のヘモグロビンの吸収や、1000 nm 以上の水の吸収の影響を受けない650 nm～900 nmの“生体の窓”と呼ばれる近赤外領域の光の利用が重要となっている。本研究では、650 nm～900 nmで蛍光発光する生体用近赤外蛍光プローブの開発を計画し、幾つかの新規近赤外蛍光プローブの合成に成功した。

研究成果の概要(英文)：The near-infrared (NIR) region (650-900 nm) is referred to as the “optical window” of cells and tissues because of the lack of efficient endogenous absorbers in this spectral range and the subsequent high penetration depth (of the order of a few millimeters) in most tissues. Organic fluorescent dyes that emit NIR fluorescence are preferable for applications in biological systems because they can reduce auto-fluorescence and photodamage to living cells. Therefore, we synthesized some new NIR fluorescent dyes for fluorescent imaging probes. For example, the absorption maxima of 2-Hydroxytryptanthrin under a pH range from 1.3 to 7.2 and from 8.5 to 10.6 were ca. 410 nm and ca. 495 nm, respectively. Moreover, the fluorescence maxima were ca. 660 nm regardless of the pH range. Its sodium salt (sodium tryptanthrin-2-olate) was water soluble and the fluorescence maxima were ca. 660 nm in both aprotic and protic solvents.

研究分野：有機光化学，超分子化学

キーワード：近赤外蛍光 蛍光プローブ 2-アミノトリプタンスリン 蛍光共鳴エネルギー移動 金属イオン 2-ヒドロキシトリプタンスリン 励起状態分子内プロトン移動

1. 研究開始当初の背景

感度の良い蛍光を用いて特定の生体物質の挙動を検出する蛍光プローブ法は、環境中の有害物質の検出等に利用される蛍光性化学センサーと共に発展してきた。例えば、カルシウムイオン (Ca^{2+}) は、細胞内の情報伝達物質として働き、生命活動を維持する重要なイオンの一つであるが、長い間、細胞内での Ca^{2+} の挙動には、不明な点が多く残されていた。これを打破するきっかけとなったのが、2008年にノーベル化学賞を受賞した、カリフォルニア大学の R.Y. Tsien 教授らによって1980年代に開発された Ca^{2+} 選択的蛍光プローブ Quin-2, Fura-2 である。これらの蛍光色素の登場により、細胞内の Ca^{2+} の動態や情報伝達物質としての役割の解明に関する研究は、大きく進歩した。また最近では、東京大学大学院 浦野泰照 教授らにより、がん細胞だけを光らせる高選択的蛍光プローブの開発も行われている。このように、蛍光プローブの重要性は非常に増しており、特に近年、“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”というケミカルバイオロジーにおいて、生命現象を理解する分子ツールとして、蛍光イメージングプローブは、その中核をなす、最も重要な研究の一つとなっている。本研究代表者は、平成7, 11~12, 14~15, 17~18, 22~24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・蛍光プローブ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1年間、米国ブリガム・ヤング大学の世界的に著名な化学者 J. S. Bradshaw, R. M. Izatt 両教授の研究グループの一員として、当時報告例の少なかった Zn^{2+} 選択的蛍光性化学センサーの開発研究に従事した経験をもつ。また、植物の藍から抽出される抗菌剤のトリプタンスリンの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1, T2NH_2) が、強い蛍光 ($\Phi_f = 0.12 \sim 0.64$) を示し、優れた正の蛍光ソルバトクロミズム ($\lambda_{\text{max}} = 516 \text{ nm} \sim 632 \text{ nm}$) を示すことを見いだしている (川上 淳, トリプタンスリン誘導体, 特許第5448046号, 平成26年1月10日登録; J. Kawakami *et al.*, *Trans. Mater. Res. Soc. Japan*, **38**(1), 123-125 (2013).)

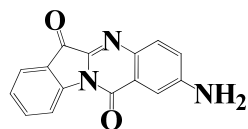


図1 2-アミノトリプタンスリン (T2NH_2)

更に、 T2NH_2 をエネルギーアクセプターとする蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 型の蛍光性化学センサーの合成にも成功している。これらの研究の過程で、近年重要性が増している、生体透過性に優れ、生体組織の観察に有用な“生体の窓”と呼ばれる、650 nm ~

900 nm の波長領域に対応した生体用近赤外蛍光プローブの開発を立案するに至った。

2. 研究の目的

生体用蛍光プローブ開発において、600 nm 以下の可視域に強い吸収をもつヘモグロビンや約 1100 nm より長波長側を吸収する水の影響も少ない“生体の窓”と呼ばれる約 650 nm ~ 900 nm の近赤外領域の光の利用が注目されている (図2)。

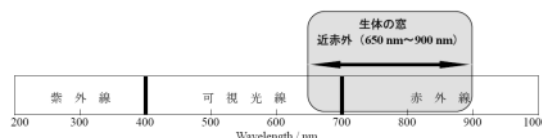


図2 生体の窓と呼ばれる近赤外領域

そこで本研究では、新規な近赤外蛍光プローブの開発を計画した。具体的には、研究代表者が見いだした有機蛍光色素 T2NH_2 のトリプタンスリン骨格を基本構造とする近赤外蛍光プローブの開発である。蛍光プローブは、生体物質の機能解析 (分析) 生命現象の解明につながる化学ツールであり、これまでの可視領域の蛍光を用いた蛍光プローブに対し、生体透過性の優れた近赤外蛍光による蛍光プローブの開発は、今後の生命科学研究において大変価値のあるものと言える。また、近年、蛍光タンパク質 (FP) の遺伝子を改変し、生理機能を探索する蛍光プローブについては数多く報告されており、遺伝子改変により発現の局在制御などが可能であることから有用とされているが、FP の発現に関する時間制御は一般的に困難であり、FP のサイズが約 27 kDa と比較的大きく、測定対象の生体反応の障害も懸念される等課題も多い。そのため、近赤外蛍光色素としてトリプタンスリン骨格を有する有機小分子を利用することは FP の応用研究が進んだ現在においても重要と言える。

本研究では、合成した近赤外蛍光プローブの吸収・発光特性及び、pH 応答性や金属イオン応答性について詳しく検討した。

3. 研究の方法

本研究では、トリプタンスリン骨格を基本構造とし、蛍光極大波長を T2NH_2 の最長 632 nm よりも長波長側の 650 nm ~ 900 nm の近赤外領域に達する様にするための方法として、環拡張、アルキニル基の導入による共役拡張、分子内電荷移動 (ICT) の促進、他の有機蛍光色素との FRET 等について検討した。具体的な手順としては、1) ~ 3) を繰り返し、改良を加えながら実用性のある近赤外蛍光プローブの構築を目指した。

- 1) 近赤外蛍光プローブの合成。
- 2) 各種分光学的測定 (NMR, IR, LC-MS, 紫外・可視吸収スペクトル, 蛍光スペクトル etc.) 及び理論計算。

3) 近赤外蛍光プローブの周辺環境 (溶媒) 応答性 (蛍光ソルバトクロミズム) pH 応答性、金属イオン応答性等の検討。

4. 研究成果

(1) 環拡張型 2-アミノトリプタンスリン誘導体

T2NH₂の環拡張系として T2NH₂の 5 員環の隣のベンゼン環にベンゼン環を 1 個及び 2 個環拡張した Benzo-T2NH₂ と Naph-T2NH₂ を合成した (図 3)。

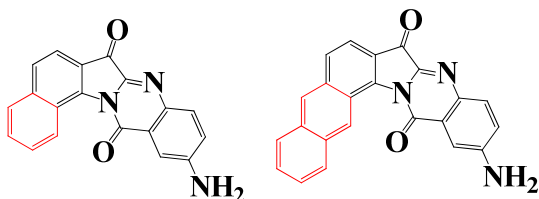


図 3 Benzo-T2NH₂ (左) と Naph-T2NH₂ (右)

Benzo-T2NH₂ は、T2NH₂ に比べて吸収及び蛍光極大波長が長波長側で観測され、水溶液中 (H₂O/DMSO = 9/1) での蛍光極大波長は近赤外領域の 682 nm であった。一方 Naph-T2NH₂ は、Benzo-T2NH₂ と同様に吸収及び蛍光極大波長は T2NH₂ よりも長波長側で観測されたが、著しい蛍光消光が見られた。T2NH₂ や Benzo-T2NH₂ の蛍光は ICT による蛍光であり、DFT 計算 (B3LYP/6-31G*) によると HOMO の電子分布は電子供与性基のアミノ基の付いたベンゼン環側に、LUMO の電子分布は電子求引性基の付いた 5 員環側に分布している。一方、Naph-T2NH₂ は、T2NH₂ と Benzo-T2NH₂ とは異なり HOMO の電子分布はアミノ基の付いたベンゼン環側ではなくナフタレン環側に局在しており、Naph-T2NH₂ の蛍光のみ ICT の寄与が小さいことが示唆された (図 4)。

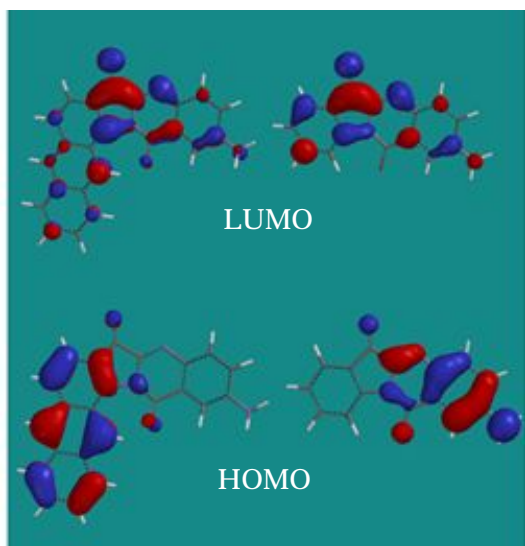


図 4 Naph-T2NH₂ (左) と T2NH₂ (右) の HOMO と LUMO の電子分布

また、Naph-T2NH₂ はアセトニトリル中水銀イオン (Hg²⁺) 存在下で殆ど蛍光を示さなくなり、アルミニウムイオン (Al³⁺) 存在下では蛍光極大波長が短波長側にシフトし蛍光強度が増大することがわかり優れた金属イオン応答性が観測された (図 5)。

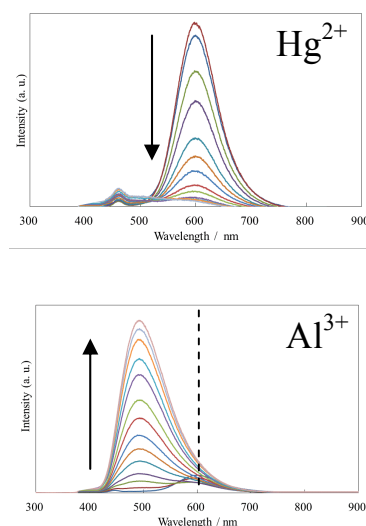


図 5 Naph-T2NH₂ の蛍光スペクトルの金属イオン応答性 ([Naph-T2NH₂] = 10 μM, Hg²⁺ and Al³⁺ = 0-1000 equiv.)

(2) 2-アミノフェニルエチニルトリプタンスリン

T2NH₂ にアルキニル基の導入による共役拡張系として T2NH₂ の 7-位、8-位、9-位にフェニルエチニル基を導入した系 T2NH₂7PE, T2NH₂8PE, T2NH₂9PE を合成した (図 6)。

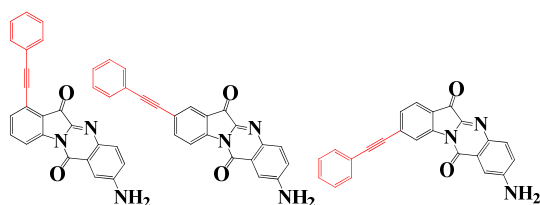


図 6 T2NH₂7PE (左), T2NH₂8PE (中), T2NH₂9PE (右)

T2NH₂7PE, T2NH₂8PE, T2NH₂9PE の吸収及び蛍光極大波長は T2NH₂ に比べていずれも長波長側で観測され、波長の長さは T2NH₂9PE > T2NH₂7PE > T2NH₂8PE > T2NH₂ の順であった。即ち、9-位での共役拡張が蛍光極大波長の長波長化に最も有効であることがわかった。T2NH₂9PE は、ジメチルスルホキシド (653 nm)、エタノール (654 nm)、メタノール (662 nm) の 3 種類の溶媒中で蛍光極大波長が 650 nm 以上で観測され、T2NH₂9PE のフェニルエチニル基の *p*-位に電子求引性基のトリフルオロメチル基を導入した T2NH₂9PE-CF₃ (図 7) では、メタノール中での蛍光極大波長が更に長波長側にシフトし 668 nm で観測されることがわかった。

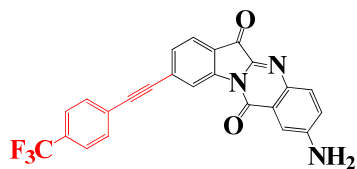


図 7 T2NH₂9PE-CF₃

(3) 2-(*N,N*-ジメチルアミノ)トリプタンスリン

ICT の促進による吸収及び蛍光極大波長の長波長側へのシフトを期待し T2NH₂ のアミノ基をより電子供与性の強いジメチルアミノ基に換えた 2-(*N,N*-ジメチルアミノ)トリプタンスリン (T2NMe₂) を合成した (図 8)。

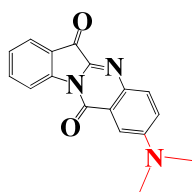


図 8 T2NMe₂

T2NMe₂ の吸収及び蛍光極大波長は T2NH₂ よりも長波長側で観測され、T2NH₂ の蛍光極大波長の最大値がメタノール中での 632 nm であったのに対し、T2NMe₂ の蛍光極大波長の最長波長は同じくメタノール中での 674 nm であった。T2NH₂ と比べて T2NMe₂ の蛍光極大波長が大きく長波長シフトしていることが蛍光の色の違いから明確にわかる (図 9)。

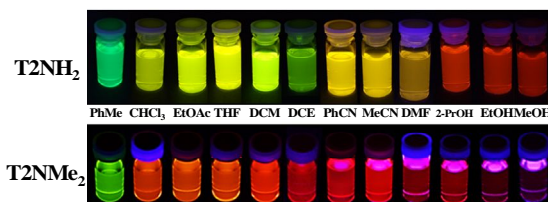


図 9 T2NH₂ と T2NMe₂ の蛍光発光 (励起波長 365 nm)

また、T2NMe₂ の蛍光量子収率の値は、比誘電率が 11 未満の溶媒中では特に高く約 0.9 であることもわかった。

(4) 2-ヒドロキシトリプタンスリンとそのナトリウム塩

T2NH₂ のアミノ基をヒドロキシ基に換えた 2-ヒドロキシトリプタンスリン (T2OH) とそのナトリウム塩 (T2ONa) を合成した (図 10)。

T2OH は基底状態では pH に応答し、酸性水溶液 (H₂O/DMSO = 9/1) 中では約 410 nm に吸収極大をもつヒドロキシ基のプロトンが会合した T2OH の吸収が観測されるが、アルカリ性水溶液中では約 495 nm に吸収極大をもつヒドロキシ基のプロトンが解離した

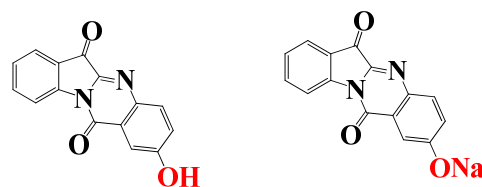


図 10 T2OH (左) と T2ONa (右)

T2O⁻ の吸収が観測される (図 11)。

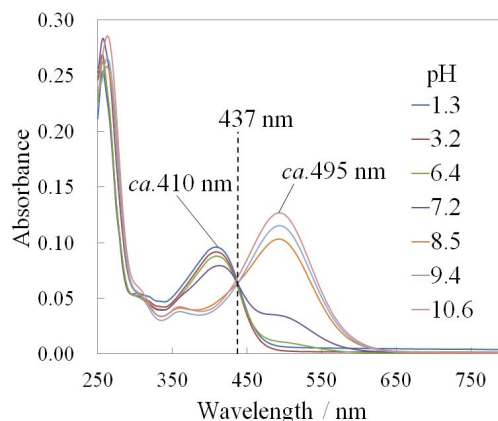


図 11 T2OH の吸収スペクトルの pH 応答性

一方、等吸収点の 437 nm で励起した蛍光スペクトルを見ると pH に影響されることなく約 660 nm に蛍光極大をもつヒドロキシ基のプロトンが解離した T2O⁻ の蛍光が観測された (図 12)。

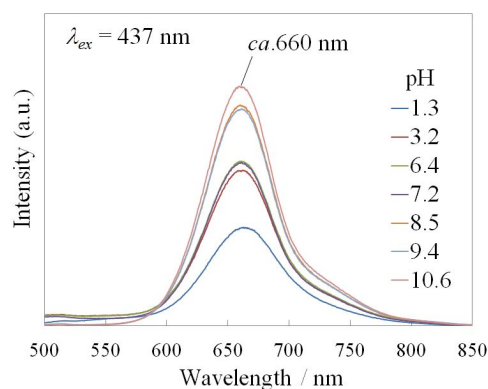
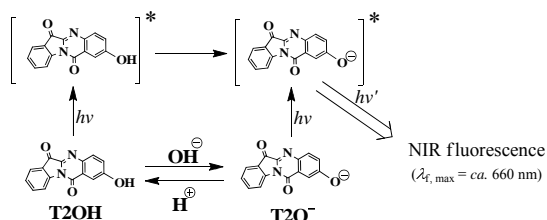


図 12 T2OH の蛍光スペクトルの pH 応答性

即ち、T2OH は励起状態では溶液の pH にかかわらず“生体の窓”と呼ばれる波長領域で蛍光を発することになる (スキーム 1)。



スキーム 1

また、T2OH のナトリウム塩の T2ONa は水によく溶解種々の非プロトン性及びプロトン性極性溶媒中で約 660 nm の蛍光を発することもわかった。

T2OH の金属イオン応答性であるが、蛍光極大波長が約 500 nm のアセトニトリル中では、 Mg^{2+} , Ba^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Ag^+ , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} の添加による蛍光スペクトルの大きな変化は見られなかったが、 Fe^{2+} , Fe^{3+} を添加すると蛍光消光しながら蛍光極大波長は長波長側にレッドシフトし、 Cu^{2+} を添加すると $[Cu^{2+}] / [T2OH] = 10$ でほぼ完全に蛍光消光した。一方、 Ca^{2+} , Hg^{2+} , Al^{3+} を添加すると長波長側の約 600 nm に新たな蛍光が観測され、選択的な金属イオン応答性が観測された (図 13)。

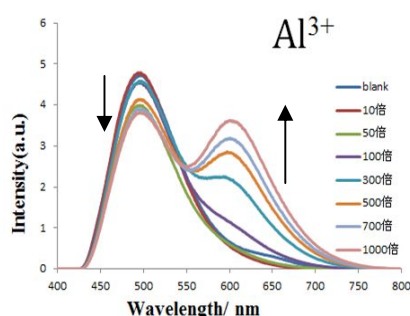


図 13 T2OH の蛍光スペクトルの金属イオン応答性 ($[Al^{3+}] / [T2OH] = 0 \sim 1000$ in MeCN)

水溶液中 ($H_2O/DMSO = 9/1$) では、金属イオン存在下でも大きな蛍光変化は観測されず 660 nm 近辺の赤色蛍光を示した。即ち、周辺環境の変化に影響されることなく蛍光発光することから近赤外蛍光プローブ (蛍光ラベル化剤) として有用であることがわかった。

上記 (1) ~ (4) の成果以外にも、トリプタンスリン誘導体と既存の有機蛍光色素の BODIPY との間の FRET 相互作用や励起状態分子内プロトン移動 (ESIPT) を示唆する挙動を示すトリプタンスリン誘導体の合成に成功しており、詳細については今後随時論文として公表していく予定である。また、今回は残念ながら *in vitro* での実験に終始し *in vivo* での実験には至らなかったが今後は *in vivo* での実験も展開したいと考えている。

以上のように、本研究ではトリプタンスリン骨格を有する新規な生体用新規近赤外蛍光プローブの開発に関する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 4 件)

J. Kawakami, T. Kadowaki, M. Ikeda, Y. Habata, S. Ito and H. Kitahara, Spectral Characteristics of Highly Fluorescent

2-(*N,N*-dimethylamino)tryptanthrin, *Trans. Mater. Res. Soc. Japan*, **41** (2), 2016, in press. (査読有)

J. Kawakami, A. Tsuiki, S. Ito, and H. Kitahara, Naphthalene Ring-Fused 2-Aminotryptanthrin as a Fluorescent Chemosensor for Al^{3+} , *Trans. Mater. Res. Soc. Japan*, **41** (1), 131-133 (2016), DOI: 10.14723/tmrj.41.131 (査読有)

J. Kawakami, M. Takahashi, S. Ito, and H. Kitahara, Photophysical Properties of the 2-Hydroxytryptanthrin and its Sodium Salt as Near-infrared Dyes for Fluorescent Imaging, *Anal. Sci.*, **32** (2), 251-253 (2016), DOI: 10.2116/analsci.32.251 (査読有)

J. Kawakami, A. Soma, K. Kikuchi, Y. Kikuchi, S. Ito and H. Kitahara, 2-Aminotryptanthrin Derivative with Pyrene as a FRET-based Fluorescent Chemosensor for Metal Ions, *Anal. Sci.*, **30** (10), 949-954 (2014), DOI: 10.2116/analsci.30.949 (査読有)

〔学会発表〕(計 15 件)

門脇拓真, 川上 淳, 伊東俊司, 2-アミノトリプタンスリン誘導体の合成と分光学的性質, 第 5 回 CSJ 化学フェスタ, 2015 年 10 月 13 日 (東京).

高橋正寛, 川上 淳, 伊東俊司, 2-ヒドロキシ及び 2-(4-アミノ)フェニルトリプタンスリン誘導体の合成と分光学的性質, 第 5 回 CSJ 化学フェスタ, 2015 年 10 月 13 日 (東京).

橋本 凌, 川上 淳, 伊東俊司, 2-アミノ-9-フェニルエチニルトリプタンスリン誘導体の合成と分光学的性質, 第 5 回 CSJ 化学フェスタ, 2015 年 10 月 13 日 (東京).

門脇拓真, 川上 淳, 伊東俊司, Synthesis and Photophysical Properties of 2-Aminotryptanthrin Derivatives, 平成 27 年度化学系学協会東北大会, 2015 年 9 月 12 日 (弘前).

高橋正寛, 川上 淳, 伊東俊司, Synthesis and Photophysical Properties of 2-Hydroxytryptanthrin Derivatives and 2-(4-Amino)phenyltryptanthrin Derivatives, 平成 27 年度化学系学協会東北大会, 2015 年 9 月 12 日 (弘前).

橋本 凌, 川上 淳, 伊東俊司, Synthesis and Photophysical Properties of 2-Amino-9-phenylethynyltryptanthrin Derivatives, 平成 27 年度化学系学協会東北大会, 2015 年 9 月 12 日 (弘前).

川上 淳, 高橋正寛, 門脇拓真, 築城彰洋, 木村光輝, 橋本 凌, 伊東俊司, 2-アミノおよび 2-ヒドロキシトリプタンスリン誘導体の吸収・発光特性, 日本化学会第 95 春季年会, 2015 年 3 月 28 日 (船橋).

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 2014 年光化学討論会 2014 年 10 月 13 日 (札幌).

木村光輝, 川上 淳, 伊東俊司, 環拡張型 BODIPY - 2-アミノトリプタンスリン誘導体の吸収発光特性, 2014 年光化学討論会, 2014 年 10 月 13 日 (札幌).

築城彰洋, 川上 淳, 伊東俊司, 環拡張型 2-アミノトリプタンスリン誘導体の吸収発光特性, 2014 年 10 月 13 日 (札幌).

川上 淳, 築城彰洋, 原田裕貴, 邊見世統, 木村光輝, 伊東俊司, 2-アミノトリプタンスリン誘導体の合成と蛍光性化学センサーへの応用, 日本化学会第 94 春季年会, 2014 年 3 月 28 日 (名古屋).

Y. Harada, J. Kawakami, S. Ito, Fluorescence properties of 2-Aminotryptanthrin Derivatives with Pyrene, The International Symposium for the 70th Anniversary of the Tohoku Branch of the Chemical Society of Japan, Sep., 28, 2013 (Sendai).

T. Henmi, N. Narita, J. Kawakami, S. Ito, 2-Aminotryptanthrin Derivatives with 7-Substituted Coumarin as FRET-based Fluorescent Chemosensors for Metal Ions, The International Symposium for the 70th Anniversary of the Tohoku Branch of the Chemical Society of Japan, Sep., 28, 2013 (Sendai).

A. Tsuiki, J. Kawakami, S. Ito, Synthesis and Photophysical Properties of Aromatic-ring-fused 2-Aminotryptanthrin Derivatives, The International Symposium for the 70th Anniversary of the Tohoku Branch of the Chemical Society of Japan, Sep., 28, 2013 (Sendai).

K. Kimura, J. Kawakami, S. Ito, Synthesis of 2-Aminotryptanthrin Derivatives with Benzo-fused BODIPY, The International Symposium for the 70th Anniversary of the Tohoku Branch of the Chemical Society of Japan, Sep., 28, 2013 (Sendai).

〔その他〕

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