

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 14 日現在

機関番号：37111
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22590051
 研究課題名(和文) 柔らかく丈夫で明るい近赤外蛍光色素の創製と分子イメージングへの適用
 研究課題名(英文) Development of lower-interactive, stable, brighter near-infrared fluorescent dyes and their application to bio-imaging
 研究代表者
 能田 均 (NOHTA HITOSHI)
 福岡大学・薬学部・教授
 研究者番号：20164668

研究成果の概要(和文)：生命科学の進展に果たす蛍光分析の役割は大きいですが、その色素には旧来より大きな進歩はない。本研究では、生体と相互作用しにくく、丈夫で、水溶性に富み、高蛍光性の色素の開発を目的とした。開発した新規色素・糖化ローダミンは、従来にはない“生体分子と相互作用しにくい”という特性を持っている。この色素はアミノ基のラベル試薬として用いることが可能で、アミノ酸、ペプチド、タンパク質等の蛍光ラベル化が可能であった。今後の色素設計のモデルとなりうる。

研究成果の概要(英文)： Fluorescence analyses play an important role in progress of biosciences, but the fluorescence dyes remain unchanged for long time. This study aimed to develop lower-interactive, stable, water-soluble, highly fluorescent dyes. The developed novel dyes “glycated rohdamines” show unique features “highly water-soluble and lower-interactivity with bio-molecules”. This study afford a typical methodology for developing new fluorescent dyes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：イメージング、蛍光色素

1. 研究開始当初の背景

蛍光分析法は、比較的簡便な装置で、高感度かつ高精度な分析が可能であり、DNA解析、チップ解析、ハイスループットスクリーニングなどの *in vitro* 分析から、分子イメージングのような *ex vivo*, *in vivo* 分析まで幅広く用いられ、生命科学の進展に寄与している。蛍光分析に用いられるプローブには、GFPなどの蛍光タンパク質、有機蛍光色素、金属錯体色素、量子ドットなどがあるが、小さなサ

イズ、対象分子への影響の少なさ、などから有機蛍光色素が選択される場合も多い。しかしながら、これらの有機蛍光色素に関しては、発光機構の考察を基にした特定物質向けの蛍光プローブ開発に大きな進展があるものの、色素自体は旧来の骨核であり、望ましい蛍光色素の特性【①生体分子と相互作用しない(柔らかい)、②退色しにくい(丈夫な)、③水溶性、④近赤外蛍光性、⑤高い蛍光量子収率、⑥ストークスシフトが大きい】を満足

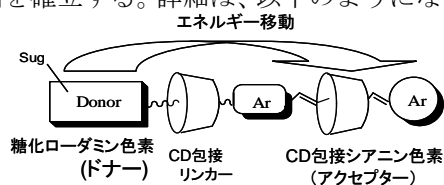
する蛍光色素は存在しない。現在、これらを最大公約数的に満たす最良の色素として、インドシアニングリーン (ICG)、CY®色素などのシアニン色素が汎用されているが、特に、①相互作用の低減、②耐退色性、⑤強蛍光性、⑥ストークスシフトの延長について、改善が求められている

2. 研究の目的

近年、蛍光分析法が生命科学の進展に果たす役割は益々拡大している。しかし、ハードウェアの著しい進歩に対して、肝心の蛍光色素自体については大きな進展はみられない。申請者は、前述の望ましい蛍光色素の特性、①～⑥を全て満足する蛍光色素を多角的アプローチでデザイン・合成し、その有用性を比較評価する。最良の色素骨核を基に、分子イメージング用蛍光プローブを創製するため、ラベル化試薬を作成してラベル化条件を最適化する。更に、モデル化合物 (タンパク質、DNA) をラベル化し、細胞内での分子イメージングに適用し、その有用性を実証する。

3. 研究の方法

開発する蛍光色素のひとつの形態を下の模式図に示す。蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) による蛍光発現を利用するため、ドナーとアクセプターの二つ色素を用いる。図では、糖修飾ローダミン系色素をドナーに、CD 包接化シアニン色素をアクセプターに用い、両者を CD 包接化リンカーで結合してロタキサン構造としている。この色素を基に、ラベル化条件を最適化し、モデルタンパク質にラベル化し、蛍光イメージングを行い、方法論を確立する。詳細は、以下になる。



(1) CD 包接化シアニン色素の開発 (上図の右部分) 最終目的色素である CD 包接化 FRET 型色素の要素化合物である CD 包接化シアニン色素を波長別 (650~900nm) を設計・合成し、各種特性 (光退色性、蛍光強度、水溶性など) を評価する。合成は、近年の関連分野の成果 (総説、H.L. Anderson ら、*Angew.Chem.Int.Ed.*, **46**, 1028, 2007) を参照しながら、効率の良い合成方法を確立する。

(2) 糖化ローダミン色素 (上図の左部分) の開発 (1) と同様の要素化合物であり、ローダミン色素を糖化し、特性評価を行う。合成は、我々の開発した糖類の蛍光ラベル化法 [K. Todoroki ら、*J. Chromatogr. A* **1038**,

113-120, 2004; 井尻聡一郎ら、*Chromatography*, **26**(Suppl.1), 121-122, 2005) を元に最適化する。

(3) CD 包接化 FRET 型色素 (上図) の開発 (1) 及び (2) の検討で、有用と考えられる色素の組み合わせにて、CD 包接化 FRET 型色素を設計し、最終的に少なくとも 3 種類の色素 (発光波長が、それぞれ 700nm、800nm、900nm 付近) を創製する。

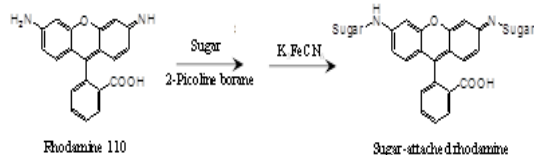
(4) ラベル化試薬の開発とラベル化法の確立 (1) ~ (4) の色素の中で最も有用と思われる色素について、ラベル用反応基 (アミノ基及び SH 基用) を修飾して、ラベル試薬を開発する。モデル化合物を使い、ラベル化法を最適化する。

(5) 分子イメージングへの適用 モデルタンパク質 (抗体) を確立したラベル化法でラベルし、細胞における動態を蛍光顕微鏡にて観察し、機能評価する。

4. 研究成果

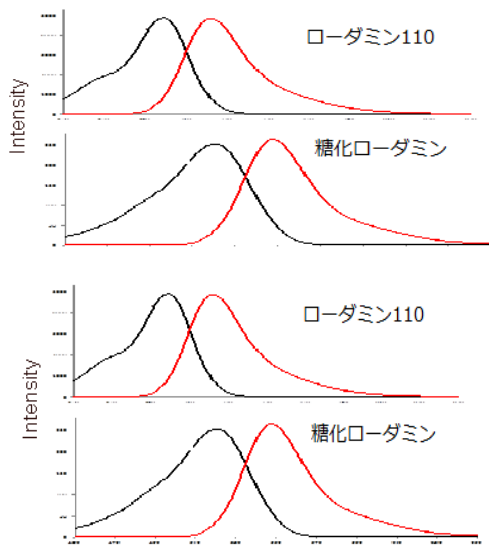
(1) CD 包接化シアニン色素の開発 CD 包接化 FRET 型色素の要素化合物である CD 包接化シアニン色素を波長別 (650~900nm) に数種類用意するため、汎用されるインドシアニングリーン (ICG) をモデル色素に、CD 包接化を試みた。予備検討より、CD が存在すると、ICG の光退色性および蛍光水溶性が格段に向上することを見出した。しかし、包接化色素の生成効率は、包接化されていない色素の 0.1% 以下であり、精製も困難であった。従って、要素化合物として用いることはできないと判断し、更なる検討は行わないこととした。

(2) 糖化ローダミン色素の開発



①色素の合成 上図のように、ローダミン色素 (ローダミン 110) の二つのアミノ基に糖を付加させることにより、糖化ローダミンを合成することができた。糖としては、単糖のグルコース、二糖のマルトースを用いた。合成手順: 300 mM 糖水溶液 10 μ L を減圧下乾固し、15 mM ローダミン 110 50 μ L 及び 1 M 2-ピコリンボラン 50 μ L 加え、90°C で 30 分間過熱した。次いで、0.25 M フェリシアン化カリウム 100 μ L 加え、室温で 30 分間放置した。反応溶液を TLC シートにて分離・精製を行った。

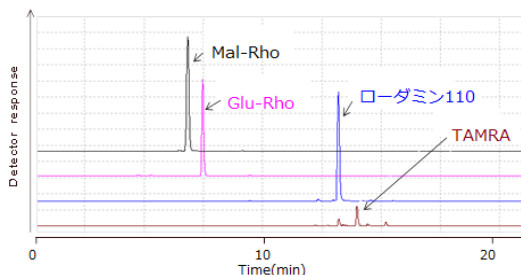
②蛍光特性 ローダミン 110 の水-メタノール混液 (1:1,v/v) 中での励起及び蛍光スペクトルは、それぞれ 499 nm 及び 522 nm であった。



褪色性に関しては、いずれも十分な強度を有しているため明確な差を見いだすことはできなかった。

③色素の性質 生体成分への非特異的吸着を考慮するにあたって、逆相 LC で溶出挙動を検討した。LC 条件：カラム:PEPTIDE 3.6 μ XB-C18(150 \times 4.6 mm)、移動相：10 % (v/v) アセトニトリル(A), 90 % (v/v) アセトニトリル(B) グラジエント溶離：[0-30 分、0 % (B) -100 % (B), 30.01-45 分、0 % (B)]、流速 1.0 mL/min。

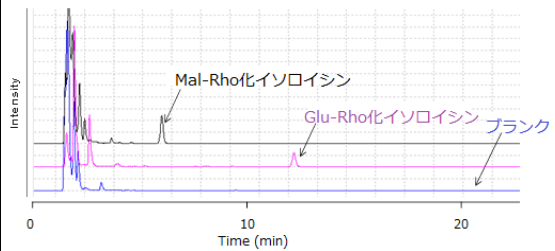
糖化ローダミン 2 種 [グルコース付加体 Glu-Rho、マルトース付加体 Mal-Rho]、ローダミン 110、TAMRA (テトラメチルローダミン) を上記 LC に附して得られたクロマトグラムを下図に示す。



上記条件のほか、数種類の移動相を用いた場合にも、全て保持時間は Mal-Rho < Glu-Rho << Rhodamine110 < TAMRA となった。糖化の影響により、親水性が増大し、疎水結合が抑制されていることが確認できた。色素母核としての有用性が期待できる。

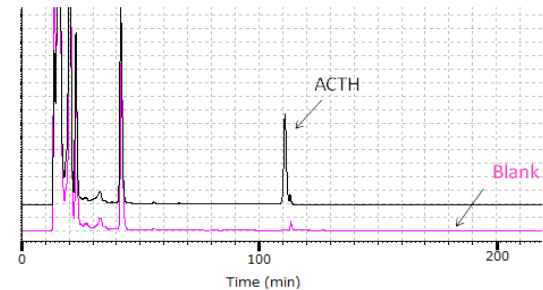
(3) ラベル化法の確立 Mal-Rho および Glu-Rho は、いずれもカルボキシル基を有しているため、アミノ基のラベル化試薬として用いることが可能と考えられる。そこで、アミノ酸のラベル化条件を検討し、次のラベル化法を確立した。試料溶液 30 μ L をバイアルにとり、30 mM 糖化ローダミン 10 μ L 及び 500 mM DMT-MM (縮合剤) 10 μ L 加えて密封し、室温で 30 分間放置した。移動相を 150 μ L 加え、そのうち 5 μ L を HPLC に注入する。

アミノ酸としてイソロイシンを用いて、Glu-Rho および Mal-Rho によりラベル化して得られたクロマトグラムを下に示す。



イソロイシンにラベル化すると Mal-Rho と Glu-Rho では、そのラベル化体の保持時間に大きな差が見られた。今後の検討には、より親水性の高い Mal-Rho を用いることとした。

上記ラベル化条件を用いて、ペプチド ACTH のラベル化を行い、次のクロマトグラムを得た。



更に、タンパク質 cytochrome のラベル化にも適用可能であった。ラベル化手順は、試料溶液 45 μ L をバイアルにとり、30 mM Mal-Rho 10 μ L 及び 500 mM DMT-MM 10 μ L 加えて密封し、室温で 12 時間放置した。その後、PBS 435 μ L を加えゲルろ過による精製を行った。ゲルろ過精製手順として、保存液を除去後、遠心分離 (800g \times 1min) を行い PBS で 3 回洗う。反応溶液 (140 μ L) をゆっくり加え、遠心分離 (800g \times 2min) することで得られた溶液を蛍光スペクトロメーター (Nano Drop) にて測定した。

今回開発した Mal-Rho および Glu-Rho は、“強蛍光性、安定かつ生体成分との相互作用の少ない色素”として有用性は極めて高いと思われる。また、本研究で開発した糖化色素

は、今後の色素設計の要素技術として活用できるものとする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

- ① Kenichiro Todoroki 他 8 名 8 番目、Fully Automated Reagent Peak-free LC Fluorescence Analysis of Highly Polar Carboxylic Acids Using a Column-switching System and Fluorous Scavenging-derivatization、*Journal of Separation Science*、36/2、2013 232-238、査読有
- ② Hayama Tadashi 他 7 名 8 番目、LC determination of Microcystins in Water Samples Following Pre-column Excimer Fluorescence Derivatization with 4-(1-Pyrene)butanoic acid hydrazide、*Analytica Chimica Acta*、755、2012、93-99、査読有
- ③ Hayama Tadashi 他 6 名 7 番目、Binary Fluorous Alkylation of Biogenic Primary Amines with Perfluorinated Aldehyde Followed by Fluorous LC-Tandem MS Analysis、*Analytica Chimica Acta*、84/19、2012、8407-8414、査読有
- ④ Takashi Yoshitake 他 7 名 7 番目、Determination of Histamine in Microdialysis Samples from Guinea Pig Skin by HPLC with Fluorescence Detection、*Skin Pharmacology and Physiology*、25/2、2012、65-72、査読有
- ⑤ Soiciro Ijiri 他 5 名 5 番目、Selective Liquid-Chromatographic Determination of Native Fluorescent Biogenic Amines in Human Urine Based on Fluorous Derivatization、*Electrophoresis*、32/24、2011、3499-3509、査読有
- ⑥ Yohei Sakaguchi 他 6 名 7 番目、Binary Fluorous Alkylation of Biogenic Primary Amines with Perfluorinated Aldehyde Followed by Fluorous LC-Tandem MS Analysis、*Journal of Chromatography A*、1218/33、2011、5581-5586、査読有
- ⑦ Kenichiro Todoroki 他 5 名 5 番目、Highly Sensitive and Selective Derivatization-LC Method for Biomolecules Based on Fluorescence Interactions and Fluorous Separations、*Journal of Chromatography B*、879/17-18、2011、1325-1337、査読有
- ⑧ Makoto Yoshitake 他 5 名 2 番目、Selective Determination of Cysteines through Precolumn Double-labeling and Liquid Chromatography Followed by Detection of Intramolecular FRET、*Analytical and Bioanalytical Chemistry*、399/4、2011、1665-1675、査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

- ① 富田陵子、アミノ酸メタボロミクスを用いた抗がん剤の治療効果判定法の開発 (3)、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 28 日、横浜市
- ② 巴山 忠、フルオラスイオンペア剤を利用したリン酸基含有化合物の選択的抽出法の開発、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 28 日、横浜市
- ③ 坂口洋平、フ還元的ジフルオラスアルキル化による生理活性アミン類の高選択的 LC-MS/MS 分析、第 72 回分析化学討論会、2012 年 5 月 19 日、鹿児島市
- ④ 巴山 忠、Fluorous Derivatization Combined with LC-MS/MS: Matrix Effect-Free Method for The Determination of Biogenic Amines、*IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011*、2011 年 5 月 22 日、京都市
- ⑤ 坂口洋平、Analysis of Sialo-Sugar Chains Using Fluorous Derivatization Followed by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry、*IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011*、2011 年 5 月 22 日、京都市

〔図書〕(計 2 件)

- ① 能田 均 他、エキシマー蛍光誘導体化による高感度生体アミン分析 (日本分析化学会編「アミノ酸・生体アミン分析 (試料分析講座)」の「2 生体アミン分析法」の「2. 1 蛍光・化学発光法」の一部)、2012、112-126(総ページ数 205)
- ② 能田 均 他、脳内神経伝達物質の高感度リアルタイム分析 (日本分析化学会編「アミノ酸・生体アミン分析 (試料分析講座)」の「1 アミノ酸・生体アミン一斉分析」の「1. 3 カテコールアミン」の一部)、2012、168-85(総ページ数 205)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
能田 均 (NOHTA HITOSHI)
福岡大学・薬学部・教授
研究者番号: 20164668
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
なし