

平成 30 年 5 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K13102

研究課題名(和文) 光安定性超分子型 蛍光色素の開発と生体イメージングへの応用

研究課題名(英文) Development of Photostable Supramolecular Fluorophores and Application to Bioimaging

研究代表者

水上 進 (MIZUKAMI, Shin)

東北大学・多元物質科学研究所・教授

研究者番号：30420433

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年、一分子イメージングや超解像イメージングなどの高輝度レーザーを用いる技術が注目を集めているが、解決すべき最大の問題点の一つが、観察時の蛍光色素の光退色である。本研究課題では、蛍光色素の光退色を抑制する新技術の開発に取り組んだ。初年度は、蛍光色素をホスト分子に包摂させることで、光退色が抑制されるか検討した結果、ある種の色素とホストの組み合わせでは劇的に光退色抑制効果が見られた。次年度は、希土類イオンを用いて光退色が抑制できることを見出し、そのメカニズムについて考察した。

研究成果の概要(英文)：Recently, microscopic imaging techniques with high intensity lasers such as single molecule imaging and super resolution imaging have attracted attention. However, one of the unsolved problems is photobleaching of fluorophores under the microscopic measurement. In this project, we developed new technologies to suppress photobleaching of fluorescent dyes. In the first year, we investigated whether photobleaching can be suppressed by incorporating a fluorescent dye in a host molecule. The photobleaching was dramatically inhibited by an appropriate combination of a certain type of dye and host. In the second year, we discovered the anti-fading effect of some lanthanide ions. We also considered the anti-fading mechanism.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：超分子化学 蛍光色素 光退色 希土類イオン

1. 研究開始当初の背景

蛍光イメージング技術は近年の生物学に欠かせない技術であり、最先端の超解像顕微鏡や1分子イメージング、さらに生きた動物個体に適用可能な近赤外蛍光イメージング等が注目されている。しかしながら、次の課題が未解決であり、これらの解決が今後の生体イメージング技術の発展の鍵だと考えられた。

(1) 蛍光色素の光安定性を向上させる技術：高輝度レーザーを用いる顕微鏡技術における蛍光色素の光安定性は極めて重要な課題である。三重項消去剤(R. B. Altman *et al.*, *Nat. Methods* 2012, 9, 68)やデンドロン(S. K. Yang *et al.*, *Nat. Chem.* 2013, 5, 692)を用いた戦略が報告されているが、十分ではない。

(2) 疎水性蛍光色素の水溶性と細胞膜透過性を両立させる技術：一般的に長波長の蛍光色素は疎水性が高く、様々な生体分子に非特異的に吸着しやすい。それゆえ、Alexa色素のようにスルホン酸基が導入されることが多い。しかしながら、スルホン酸の負電荷により細胞膜透過性が消失することが知られており、水溶性と細胞膜透過性を両立させる分子開発戦略が課題となっている。

2. 研究の目的

蛍光色素を物理的に保護するホスト分子を用いた超分子設計、ならびに励起三重項状態を物理化学的に消去する戦略により、蛍光色素の光安定性の向上技術を開発する。

3. 研究の方法

以下の二つの手法で、蛍光色素の光退色を抑制できるかどうかを検討した。

- (1) 有機ホスト化合物による包摂体の形成
- (2) 希土類金属イオンを用いた励起三重項状態のクエンチング

4. 研究成果

(1) 蛍光色素を包摂する有機ホスト分子としては cucurbit[*n*]uril に着目し、中でも蛍光色素の大きさと近い cucurbit[7]uril (CB7) および cucurbit[8]uril (CB8) を選択した。蛍光色素は一般的に使用されているものを選択し、これらを含む緩衝液に CB 類を添加し、吸収スペクトル変化からその包摂挙動を調べた。CB 類は水素結合のアクセプターとして働く複数のカルボニル基を有していることから、カチオン性の色素(ローダミン、シアニン類)において良い取り込みが観測された。特に立体的に包摂されやすい pyronine Y は CB7 および CB8 の相方に強く取り込まれ、550 nm 付近の吸収極大値が減少する顕著なスペクトル変化が観察された。続いて、これらの pyronine Y-CB 錯体の緩衝溶液に Xe ランプで光照射を行い、その光安定性を調べた。大気下およびアルゴン雰囲気下の双方において検討した結果、特に大気条件下において

CB7 が顕著な光安定性向上効果を示した。一方、CB7 よりも強く錯体を形成した CB8 においては、大気下、アルゴン雰囲気下の双方において、目立った光安定性の向上は見られなかった。以上の結果は、ホスト原子による蛍光色素の包摂が、分子状酸素による酸化反応を物理的に抑制していることを示唆しており、結合強度よりもホストのサイズがその効果に大きく影響することが示唆された。今後、本知見をもとに光耐性の優れた超分子型の色素が開発されると期待できる。

(2) 蛍光色素が光退色を起こす主な原因は、長寿命の励起三重項状態が起点となり、一重項酸素の生成やそれによる色素酸化などが生じるためと考えられる。それゆえ、長寿命の励起三重項状態を素早く基底状態へと戻すことにより、色素の光安定性の向上が達成できると期待される。一般的に、三重項状態の色素を緩和し基底状態へと戻す物質は Triplet State Quencher (TSQ) と呼ばれるが、本研究では希土類イオンがその発光メカニズムから T_1 状態の色素のエネルギーアクセプターとして働くことで、 T_1 寿命を短縮させ、その結果光退色を抑制するのではないかという仮説を立てた。複数の希土類イオンを蛍光色素溶液に添加し、実際に色素の光安定性を向上させるかどうかについて検討した。希土類イオンと fluorescein を水溶液中に溶かし、そこに光照射した際の褪色による蛍光強度の減衰の時間変化を測定した。この減衰曲線を $F = F_0 \exp(-t/\tau) + C$ の式でフィッティングすることにより蛍光持続時間である survival time (τ) を算出した。ここに各種希土類イオンを添加し光安定性の指標である survival time をそれぞれ算出した。Pr³⁺, Nd³⁺, Eu³⁺, Ho³⁺, Er³⁺ などある種の希土類イオンを添加することにより fluorescein の光安定性が向上した。中でも Nd³⁺ イオンを添加することにより fluorescein の光安定性が劇的に向上し、survival time が約 11 倍延長した。

希土類イオンの抗光退色効果のメカニズムを解明するため、過渡吸収スペクトルを測定した。過渡吸収スペクトルから、色素の励起三重項寿命を求め、各種希土類イオンを添加の影響を調べたところ、光安定性を向上させた希土類イオン添加の際に三重項寿命が短縮する結果が得られた。最も光安定性を向上させた Nd³⁺ イオンに対し、色素の励起三重項寿命と Nd³⁺ の濃度の相関を調べたところ、三重項寿命の逆数が Nd³⁺ 濃度に対し直線のグラフ ($1/\tau = 1/\tau_0 + k_1[\text{Nd}^{3+}]$) に乗り、速度定数 $k_1 = 2.3 \times 10^8 \text{ (M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$ を得た。

最後に、Nd³⁺ による三重項状態のクエンチの原因を調べるために、fluorescein と Nd³⁺ イオンを水溶液中に溶かし fluorescein を励起した際の Nd³⁺ イオンの発光スペクトル測定を行った。Nd³⁺ イオンの濃度を固定し、fluorescein の濃度を増加

させると Nd³⁺ イオンの発光スペクトルの増大が見られたことから、fluorescein から Nd³⁺ イオンへとエネルギー移動が起こっていることが示された。これにより、Nd³⁺ は励起三重項状態の fluorescein からエネルギー移動を起こすことにより、その寿命が短縮し、それによって抗光退色効果が出たと推察される。今後、本研究で発見した現象の一般性を調べることにより、汎用性のある蛍光色素の光安定化技術に繋がることが期待される。

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7件)

Yusuke Matsui, Shin Mizukami, Kazuya Kikuchi “Ratiometric Imaging of Intracellular Mg²⁺ Dynamics Using a Red Fluorescent Turn-off Probe and a Green Fluorescent Turn-on Probe”, 査読有, *Chem. Lett.* **2018**, *47*, 23-26.

DOI: 10.1246/cl.170918

Ryota Sato, Jun Kozuka, Masahiro Ueda, Reiko Mishima, Yutaro Kumagai, Akimasa Yoshimura, Masafumi Minoshima, Shin Mizukami, Kazuya Kikuchi “Intracellular protein-labeling probes for multicolor single-molecule imaging of immune receptor-adaptor molecular dynamics”, 査読有, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 17397-17404.

DOI: 10.1021/jacs.7b08262

Yusuke Matsui, Yosuke Funato, Hiromi Imamura, Hiroaki Miki, Shin Mizukami, Kazuya Kikuchi “Visualization of Long-term Mg²⁺ Dynamics in Apoptotic Cells with a Novel Targetable Fluorescent Probe”, 査読有, *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 8255-8264.

DOI: 10.1039/c6sc04435b

Yusuke Matsui, Kalyan K. Sadhu, Shin Mizukami, Kazuya Kikuchi “Highly Selective Tridentate Fluorescent Probes for Visualizing Intracellular Mg²⁺ Dynamics without Interference from Ca²⁺ Fluctuation”, 査読有, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 10644-10647.

DOI: 10.1039/c7cc06141b

Shin Mizukami, Masayoshi Kashibe, Kengo Matsumoto, Yuichiro Hori, Kazuya Kikuchi “Enzyme-Triggered Compound Release using Functionalized Antimicrobial Peptide Derivatives”, 査読有, *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 3047-3053.

DOI: 10.1039/c6sc04435b

Shin Mizukami, Targetable Fluorescent Sensors for Advanced Cell Function Analysis, 査読有, *J. Photochem.*

Photobiol. C **2017**, *30*, 24-35.

DOI: 10.1016/j.jphotochemrev.2017.01.003

Hiroki Maeda, Toshiyuki Kowada, Junichi Kikuta, Masayuki Furuya, Mai Shirazaki, Shin Mizukami, Masaru Ishii, Kazuya Kikuchi “Real-Time Intravital Imaging of pH Variation Associated with Osteoclast Activity”, 査読有, *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12*, 579-585.

DOI: 10.1038/nchembio.2096

[学会発表](計13件)

水上進, 分子のレジデンス制御を設計指針とした生体解析プローブの開発, 日本化学会第98春季年会, 2018年

水上進, 機能性分子局在化技術のバイオイメージングへの展開, 日本化学会第98春季年会, 2018年

水上進, 機能性分子設計に基づく生体イメージング技術の開発, ニコンイメージングセンター学術講演会, 2017年

水上進, 低分子~ナノ粒子プローブによる生体内現象の可視化, 2017年光化学討論会(市民公開講座)バイオイメージング最前線講演会, 2017年

水上進, 分子・材料の機能設計に基づく生体解析技術の開発, 第34回無機・分析化学コロキウム, 2017年

井元琢真, 水上進, 菊地和也, 有機蛍光色素の光安定性に及ぼす希土類イオン添加の効果, 日本化学会第97春季年会, 2017年

水上進, Development of Bioanalytical Technologies Based on Rational Design of Organic-Nano Hybrid Materials, 第94回日本生理学会, 2017年

水上進, 機能性プローブ設計に基づく生体機能解析技術の開発, 愛媛大学大学院医学研究科・分子病態医学セミナー, 2017年

水上進, Development of bioanalytical tools based on organic-inorganic hybrid nanomaterials, HOKUDAI-NCTU International Joint Symposium on Nano, Opto and Bio Sciences, 2017年

Takuma Imoto, Shin Mizukami, Kazuya Kikuchi, Strategy to improve photostability of fluorescent dyes by using lanthanide ion, Labeling & Nanoscopy 2016, 2016年

水上進, Bioimaging and bioanalytical applications with middle molecules on nanomaterials, Satellite International Mini Symposium on Middle Molecular Strategy in Sendai, 2016年

水上進, Development of molecular imaging probes constructed of small molecules, proteins, and nanomaterials, 化学系学協会東北大会, 2016年

水上 進, Fluorescent probes with
molecular targeting property,
CWRU-Tohoku 3rd Joint workshop, 2016
年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.tagen.tohoku.ac.jp/lab/mizukami/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水上 進 (MIZUKAMI SHIN)

東北大学・多元物質科学研究所・教授

研究者番号：30420433

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

菊地 和也 (KIKUCHI KAZUYA)

大阪大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：70292951

(4) 研究協力者

井元 琢真 (IMOTO TAKUMA)

大阪大学・大学院工学研究科・大学院生