

平成21年6月8日現在

研究種目：萌芽研究
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19659007
 研究課題名（和文） 酸化ストレスを可逆的に捕捉できる Redox 応答型蛍光プローブの設計
 研究課題名（英文） Design of fluorescent probes for reversible sensing redox cycles coupled with oxidative stress
 研究代表者
 前田 初男 (MAEDA HATSUO)
 兵庫医療大学・薬学部・教授
 研究者番号：00229311

研究成果の概要：活性酸素種（ROS）の存在量に呼応して蛍光応答を与える、つまり、酸化ストレスを可逆的に捕捉できる redox 応答型蛍光プローブの設計を試みた。作業仮説に基づき設計合成した幾つかのプローブ候補化合物についてプローブ特性を評価した。その結果、カテコール核をある種のリンカーを用いてベンゼン環部位に導入した蛍光色素フルオレセイン類は、蛍光オフ状態にあるが、NaOCl との反応や電気化学的酸化により蛍光オン状態になることを見出した。しかし、それらの化合物には可逆的な機能を観察できなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	0	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	0	3,300,000

研究分野：イメージング

科研費の分科・細目：物理系薬学

キーワード：蛍光プローブ，酸化ストレス，可視化計測，レドックス，活性酸素種

1. 研究開始当初の背景

好氣的生物の宿命として ROS の発生（いわゆる酸化ストレス）とそれによる障害の蓄積が、心筋症、脳細胞障害、糖尿病等の成人病ならびに老化現象と深く関わっている。その結果、ROS の可視化計測が、成人病の病

因・病態や老化現象の原因を解明するだけでなく、好氣的生物の生命現象を解明するために重要なツールになっている。その可視化計測の基盤となるのが蛍光プローブであり、その開発研究は今も尚、世界中で活発に行なわれている。

一方、酸化ストレスは ROS 発生系と消去系のバランスの崩れに起因する。従って、成人病の病因・病態や老化現象と酸化ストレスとの関係を厳密に評価するためには、消去系を必ず考慮する必要がある。消去系を踏まえた酸化ストレスの可視化計測は、生体(細胞)内の redox バランスを可逆的に捕捉できる蛍光プローブを用いて初めて行える。しかし、ROS 発生(酸化的雰囲気)に対して正(または負)の応答を、そして、ROS 消去(還元的雰囲気)に対して負(または正)の応答を与えるというような可逆的応答を示すプローブは全く存在しない。(本課題研究を遂行中に、残念ながら、世界で最初の redox 応答型蛍光プローブが開発された: *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 3458–3459)

2. 研究の目的

本研究では、成人病の病因・病態や老化現象に深く関わる ROS の発生・消去過程を包括的に表現する redox バランスを対象とし、その崩れを可逆的に捕捉できる蛍光プローブの設計開発を通して、酸化ストレスについてダイナミックな化学情報を提供できる手法を確立する。究極の目的は Figure 1 に模式的に示したような結果を細胞内 redox バランス変動の実像として補足できる蛍光測定法の開発である。

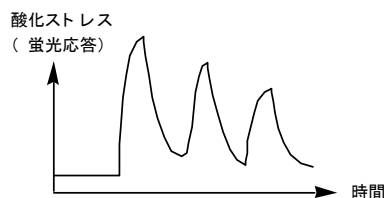


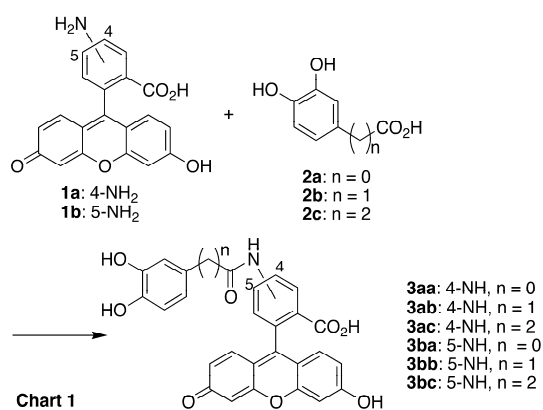
Figure 1

3. 研究の方法

(1) プローブ候補化合物の合成と特性評価

redox バランスに応答する蛍光スイッチ素子としてカテコールを選んだ。一方、蛍光色素としては、水溶性だけでなく、官能基を

有する誘導体の入手容易さを考慮し、フルオレセインを選んだ。カテコール核をアミド結合を介してフルオレセインに導入するため、**2a**, **2b** または **2c** と 4-amino または 5-aminofluorescein (**1a**, **1b**) との縮合反応を計画した (Chart 1)。設計したプローブ候補化合物 **3aa** ~ **3bc** においては、カテコール核とフルオレセイン骨格を構成するベンゼン環とを結ぶリンカーの長さおよび結合位置が異なる。その結果、これらの候補化合物において、光誘起電子移動 (PeT) に起因する蛍光消光現象が異なった程度で観察されると予想された。



まず、**3aa** ~ **3bc** の合成を、DCC, WSC などのカルボジイミド系縮合剤を用いて行なったところ、複雑な混合物を与えたのみであった。その原因は、用いた **1** および **2** が高度に水酸化されているためと考えられた。すなわち、**1** および **2** に存在する水酸基を保護する必要があると示唆された。しかし、水酸基を保護する場合、保護基の最適化ならびに脱保護反応の検討が必要になる。したがって、より簡便な合成法を確立するためには、保護・脱保護反応を用いない方が良いと判断した。そこで、**1** および **2** から **3** の直接的な合成を可能とする縮合剤を探索検討したところ、PyBOP が利用できることを見出した。このホスホニウム塩系縮合剤を用いて DMF 中、室温で反応を行なうと、低収率ながら (< 5%),

目的とするプローブ候補化合物 **3aa** ~ **3bc** (Chart 1) が得られた。

これらの候補化合物の蛍光特性を、蛍光光度計を用いて得た蛍光スペクトルを解析することにより評価した。その結果、予想した通りの興味深い知見を得た。すなわち、**3aa**, **3ab**, **3ba** および **3bb** の相対蛍光量子収率 (ϕ_f) は 0.4 以上であり、これらの化合物においては、カテコール核の導入により誘起されると期待した PeT による蛍光消光効果は小さかった。一方、**3ac** と **3bc** の ϕ_f は、それぞれ 0.07 と 0.18 であり、これらの化合物においてはカテコール核の導入に起因する蛍光消光が観察された。これらの結果から、フルオレセインのキサンテン環ではなくベンゼン環にカテコール核のような電子豊富な官能基を導入する場合、その官能基のキサンテン環に対する 3 次元的な位置が PeT を誘起するために重要であることが明らかになった。現在、観察された現象の起原を解明するため、計算化学的手法を用いて検討している。

5(6)-carboxyfluorescein と dopamine を縮合させることにより、**3ac** および **3bc** とはアミド結合が逆転した構造を持つプローブ候補化合物の合成も試みた、しかし、同様な条件を用いて反応を行なったが、複雑な混合物を得るに終わった。

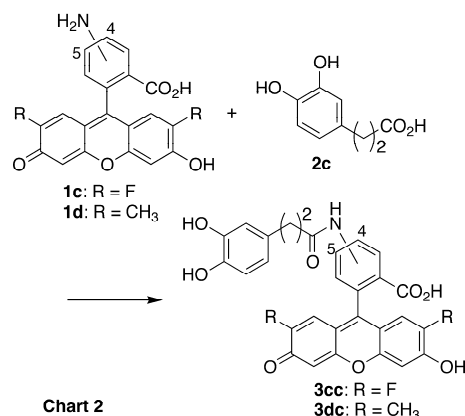
(2) プローブ候補化合物の ROS 反応性

カテコール核を蛍光スイッチ素子として選んだ理由は以下の通りである：還元（カテコール）体において PeT により蛍光色素の蛍光消光が起こる；酸化（キノン）体において PeT が解消され、蛍光色素に由来する蛍光が観察される。この考えに基づけば、蛍光消光がより強く観察された **3ac** が **3bc** よりもプローブ候補化合物としての可能性は高い。そこで、**3ac** について、様々な ROS に

対する反応性について蛍光回復を指標として検討した。反応は、25 μM **3ac** と 1 mM ROS について 37°C で pH 7.4 HEPES 緩衝液中で 10 分間行なった。その結果、スーパーオキシド (O_2^-)、過酸化水素 (H_2O_2) およびヒドロキシラジカル ($\text{HO}\cdot$) との反応では蛍光回復はほとんど観察されなかった。しかし、**3ac** を次亜塩素酸 (NaOCl) と処理すると、バックグラウンドに比べて蛍光応答が 2.9 倍に増加した。この結果から、期待したように、導入したカテコール核がキノン体に変換されれば、PeT が解消されることが示唆された。

(3) プローブ候補化合物の最適化

上記の結果を踏まえて、プローブ候補化合物の最適化を図るため、**3ac** のキサンテン環にフッ素またはメチル基を導入した **3cc** と **3dc** を合成した (Chart 2)。ただし、これらの化合物の原料となる **1c** と **1d** は 4-nitrophthalic anhydride を出発物質として用いて合成したため、分離不可能な 4-NH 体および 5-NH 体の混合物として得た。尚、**3cc** および **3dc** における 4-NH 体と 5-NH 体の比は、どちらの場合も、ほぼ 6 : 4 であることが ^1H NMR スペクトルから推定された。



3cc と **3dc** について同様に蛍光スペクトルを測定し ϕ_f を見積もったところ、それぞれ、0.06 と 0.11 であった。キサンテン環の電子

密度が低い **3cc** において、4-NH 体と 5-NH 体の混合物であるにも関わらず、**3ac** に比べ、より効果的な **Pet** による蛍光消光が観察された。

3ac と同様に、**3cc** および **3dc** (終濃度 25 mM) は、それぞれ、NaOCl (終濃度 1 mM) との pH 7.4 HEPES 緩衝液中、10 分間、37°C での反応により蛍光応答が 2.2 および 2.8 倍に増加した。

(4) 蛍光回復機構の検討

3ac, **3cc** および **3dc** において観察された NaOCl との反応による蛍光回復機構を検討した。すなわち、これらの化合物 (0.1 mM) の pH 7.4 HEPES 緩衝溶液について、作用電極および参照電極にそれぞれ白金および Ag / AgCl 電極を用いてサイクリックボルタムメトリー (CV) を行なった。その結果、**3ac**, **3cc** および **3dc** は、可逆な redox 波を 0.4 V 付近に、不可逆な酸化波を 0.8 V 付近に示した。前者の redox 波はカテコール核に、後者の不可逆波はフルオレセイン骨格のキサンテン環に由来すると考えられる。そこで、CV において電位を走印しながら、光ファイバー蛍光検出器を用いて蛍光応答を測定し、酸化状態と蛍光応答の関係を評価した。その結果、0.4 V 付近に観察された redox 波ではなく 0.8 V 付近に観察された酸化波に呼応して蛍光応答が微弱ながらも観察された。また、白金電極および Ag / AgCl 電極をそれぞれ作用極および参照電極として用いて定電位電解を pH 7.4 HEPES 緩衝液中で行いながら蛍光を測定した場合、0.4 V での電解では全く蛍光応答が観察されなかったが、0.8 V で電解した場合は通電量に比例して蛍光応答が観察された。一方、これらの化合物を NaOCl と処理し蛍光オン状態にすることにより得た緩衝溶液に、大過剰の還元剤グルタチオン (GSH) やヒドロサル

ファイトナトリウム ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) を加えて 37°C で 30 分間放置しても、蛍光オフ状態には変換されなかった。これらの結果から、NaOCl との反応により酸化されたのはキサンテン環であり、カテコール核のキノン体への酸化は蛍光回復過程に全く関与していないと推定された。その結果、合成したプローブ候補化合物には可逆的な機能が備わっていないことが明らかになった。

4. 研究成果

期待した redox 応答型蛍光プローブの設計開発には成功しなかったが、以下の成果をあげた。

- フルオレセインが有する水酸基を保護することなく、フルオレセイン骨格を構成するベンゼン環へ、アミド結合を介して機能性官能基を導入する方法として、PyBOP を用いる縮合反応が有効であることを示した。
- フルオレセイン骨格を構成するベンゼン環に PeT 機能を有する官能基を導入する場合、リンカーの長さおよび結合位置を考慮すべきであることを見出した。
- redox 状態と蛍光応答の関係を評価するために CV や定電位電解法などの電気化学的手法と光ファイバー蛍光検出器を用いる蛍光測定法の併用が有効であることを示した。
- カテコール核を導入した化合物に特異的なものであるか否かは明らかではないが、フルオレセイン骨格を構成するキサンテン環は過剰の NaOCl により酸化を受ける可能性があることを見出した。

これらの成果に基づき、現在、カテコール以外で redox 状態に呼応するスイッチ素子としての機能が期待される ferrocene および N-hydroxyphthalimide をフルオレセイン類に導入したプローブ候補化合物の合成に

取組んでいる。それらについて、今回の課題研究で確立した合成法や評価方法を適用することにより、近い将来、redox 応答型蛍光プローブの開発に成功すると信じて止まない。

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)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 前田初男, ” Highly Specific Fluorescent Probes for Reactive Oxygen Species” , 10th Conference of Methods and Application of Fluorescence: Spectroscopy, Imaging and Probe (MAF 10), 2007 年 9 月 11 日, ザルツブルグ, オーストリア.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田初男

兵庫医療大学・薬学部・教授

研究者番号：00229311