

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 24 年 4 月 1 日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21750077

研究課題名（和文） 細胞内レドックス状態のリアルタイムイメージングを達成する
蛍光試薬の創製研究課題名（英文） Development of fluorescent reagents for the real-time imaging
of intracellular redox state

研究代表者

宗 伸明 (SOH NOBUAKI)

佐賀大学・農学部・准教授

研究者番号：90336008

研究成果の概要（和文）：本研究においては、細胞内レドックス状態を計測することを目的とした新しい蛍光試薬の開発を試みた。新規蛍光試薬の構造として、蛍光基部位としてはシアニン化合物(Cy)、ペリレンビスイミド化合物(PBI)、酸化還元応答性部位としてはナフトキノン(NQ)、アントラキノン(AQ)を選択し、これらを連結することにより、目的とした新規蛍光試薬 Cy-NQ、及び PBI-AQ を得た。得られた新規蛍光試薬の蛍光測定を行った結果、両蛍光試薬のレドックス反応に対する応答性が観測された。

研究成果の概要（英文）：Novel fluorescent reagents were developed for monitoring redox state. The fluorescent reagents (Cy-NQ, PBI-AQ) consist of fluorophore unit (cyanine (Cy), perylene bisimide (PBI)) and redox-responsive unit (naphthoquinone (NQ), anthraquinone (AQ)). Fluorescent responses of the fluorescent reagents were observed based on the redox reactions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生体分析化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：レドックス、蛍光

1. 研究開始当初の背景

レドックス反応（酸化還元反応）は、生物が生命活動を営む上で極めて重要である。生体内で生じる複雑かつ動的なレドックス反応が、細胞の増殖、分化、細胞周期制御をはじめとする様々な生命現象に密接に関与することが明らかとされてきており、その詳細に関する関心は、益々高まりを見せている。生体内レドックス反応の本質には、強力な酸化力を有する種々の活性酸素種（Reactive

Oxygen Species: ROS）が深く関与しており、その産生異常は生体内レドックス反応の均衡を破綻させることから、生物個体における多様な疾病や癌化に繋がると考えられている。従って、細胞内レドックス状態の解析、更にはその疾病・癌化との関連性解明のため、現在、生体内 ROS の産生をモニタリングする手法の開発が切望されている。

蛍光プローブとして知られる一群の機能的蛍光試薬は、ターゲットとした生理活性種

を生き細胞内においてモニタリングすることが可能であり、その産生に関する時空間的な情報を得ることができることから、近年、非常に大きな注目を集めている。ROS をターゲットとした蛍光プローブについても複数報告が成されており、これらはその特長から選択的 ROS プローブと総体的 ROS プローブの二種に大別されると考えられる。すなわち前者は、各種 ROS と高選択的に反応可能なプローブであり、各 ROS の固有の生理活性を解析する上で重要である。一方、後者は広範な種類の ROS と反応するプローブであり、ROS の総和により決定される細胞内レドックス状態に関する情報を得る上で重要であると言える。前者の選択的 ROS プローブに関しては近年精力的な研究が成されており、各種 ROS に対して高い選択性を示す様々な蛍光プローブが報告されている。一方で、後者の総体的 ROS プローブとしては、ロイコ色素類等が幾つか知られてはいるものの、安定性に欠ける等の問題があり、新たな蛍光プローブの開発が待ち望まれている状況であった。

2. 研究の目的

上述した背景から、本研究では生細胞におけるレドックス状態、すなわち細胞内 ROS の総体を計測可能な新しい蛍光プローブを開発することを目的とした。より具体的には、蛍光イメージング計測に適した蛍光基ユニットとレドックス反応に反応する酸化還元ユニットを結合することにより、新たな高性能総体的 ROS プローブの開発を目指した。この新規 ROS プローブにレドックス分子が作用した場合、酸化還元ユニットがレドックス分子に反応することで、酸化還元ユニットと蛍光基ユニット間の電子的相互作用が変化し、これに応じて蛍光プローブの蛍光強度が変化することが期待できる。本研究では、このような蛍光基ユニットと酸化還元ユニットという二つの機能性ユニットを利用することで、従来のロイコ色素類とは異なる新たな総体的 ROS 蛍光プローブを開発することを試みた。

3. 研究の方法

既に述べたように、本研究では蛍光基ユニットと酸化還元ユニットを結合することによって、新しい総体的 ROS 蛍光プローブを開発する。蛍光基ユニットの蛍光基としては、蛍光イメージングにおいて望まれる長波長領域に蛍光を発するシアニン化合物 (Cy) 並びにペリレンビスイミド化合物 (PBI) を選択した。一方、酸化還元ユニットとしては、生体内においてレドックス反応を行うことでも知られるキノン化合物に着目し、ナフトキノン (NQ) 並びにアントラキノンを利用することとした。具体的には、シアニン

化合物とナフトキノンを結合した新規蛍光プローブ Cy-NQ、及びペリレンビスイミド化合物とアントラキノンを結合した新規蛍光プローブ PBI-AQ を有機化学的手法に基づき合成し、その性能を検討した。この際、生成物の確認は¹H-NMR測定、質量分析等により行った。また、レドックス応答性については、レドックス活性物質添加に伴う蛍光強度変化を測定することにより評価した。PBI-AQ の合成に当たっては、固相ペプチド合成の手法を利用した。この際、蛍光基ユニットへ親水性アミノ酸あるいは親水性ポリマーであるポリエチレングリコールを結合することで、蛍光基ユニットの水溶化に関する試みも同時に行った。

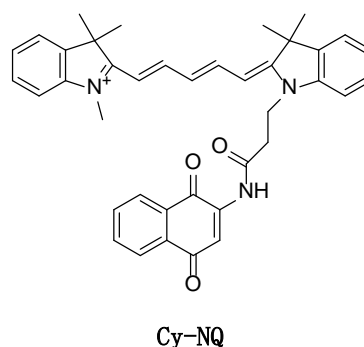
4. 研究成果

(1) 新規 ROS 蛍光プローブ Cy-NQ の開発

① Cy-NQ の合成

まず、1,1,3,3-テトラメトキシプロパン及び2,3,3-トリメチルインドレンを出発原料とし、カルボキシル基を導入したシアニン化合物を合成した。次に、1,4-ナフトキノンを出発原料として、アミノ基を導入したキノン化合物を合成した。両者をアミドカップリングにより結合し、目的化合物である Cy-NQ (図1(a)) を合成した。また、蛍光測定用の参照化合物として、メチル化した Cy 化合物 (Me-Cy) (図1(b)) も同時に合成した (Cy-NQ 合成時の副生成物として得られた)。

(a)



(b)

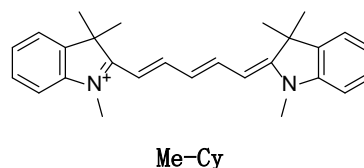


図1 (a) Cy-NQ の構造、(b) Me-Cy の構造

②Cy-NQ の特性評価と蛍光測定

まず、得られた蛍光プローブ Cy-NQ の基礎特性について検討を行った。最初に吸収スペクトル測定を行ったところ、470 nm 付近にキノン化合物に由来すると推察される吸収帯を確認することができた。次に、絶対 PL 量子収率測定装置を用いて、クロロホルム、アセトニトリル、メタノール、エタノール、ジメチルスルホキシドの各溶媒中において、Cy-NQ と Me-Cy の蛍光量子収率の測定を行った。その結果、Cy-NQ の蛍光量子収率がメチル化 Cy の蛍光量子収率と比較して十分に減少しており、シアニンユニットとキノンユニットの間で期待した電子的な相互作用が生じていることが示唆された (表 1)。

表 1 Cy-NQ と Me-Cy の蛍光特性

solvent		λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Φ	Ratio
Chloroform	Cy-NQ	650	668	0.061	3.2
	Me-Cy	655	674	0.193	
Acetonitrile	Cy-NQ	643	661	0.025	5.7
	Me-Cy	641	662	0.143	
Methanol	Cy-NQ	644	661	0.036	3.9
	Me-Cy	641	661	0.140	
Ethanol	Cy-NQ	651	667	0.010	18.0
	Me-Cy	646	666	0.180	
DMSO	Cy-NQ	650	668	0.082	4.0
	Me-Cy	647	669	0.328	

そこで次に、Cy-NQ に対して、生体中にも存在する還元剤であるアスコルビン酸を添加した。その結果、添加したアスコルビン酸の濃度に対応して、蛍光強度の増大が生じることが明らかとなり (図 2、図 3)、Cy-NQ が生体内レドックス反応を検出する上で有用であることが期待できることが示唆された。

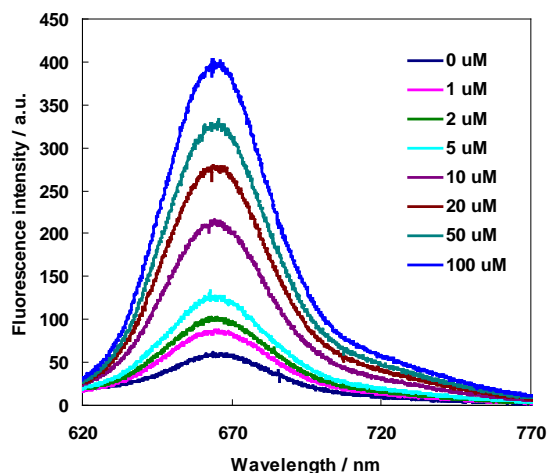


図 2 アスコルビン酸添加に伴う Cy-NQ の蛍光スペクトル変化

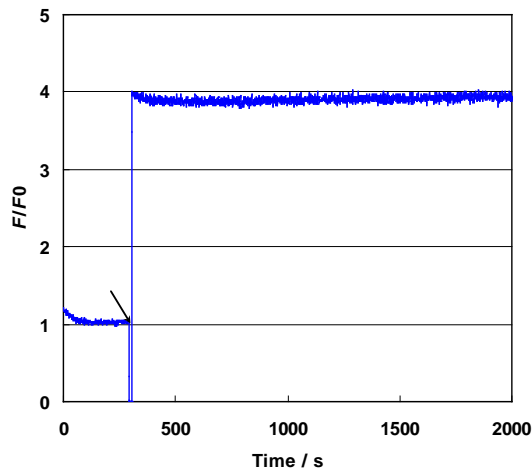


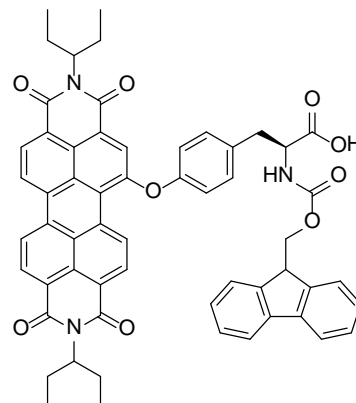
図 3 アスコルビン酸添加に伴う Cy-NQ の蛍光強度の時間変化

次に、Cy-NQ の細胞導入についても検討した。その結果、Cy-NQ を生細胞に導入した場合には、死細胞に導入した場合と比較して細胞質から強い蛍光が観測され、細胞内物質による Cy-NQ の還元が生じたことが示唆された。

(2) 新規 ROS 蛍光プローブ PBI-AQ の開発

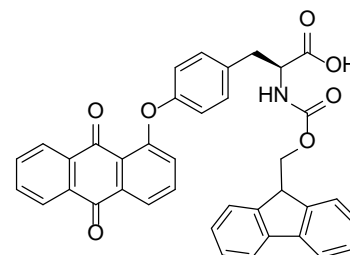
①PBI-AQ の合成

(a)



Fmoc-Tyr (PBI)-OH

(b)



Fmoc-Tyr (AQ)-OH

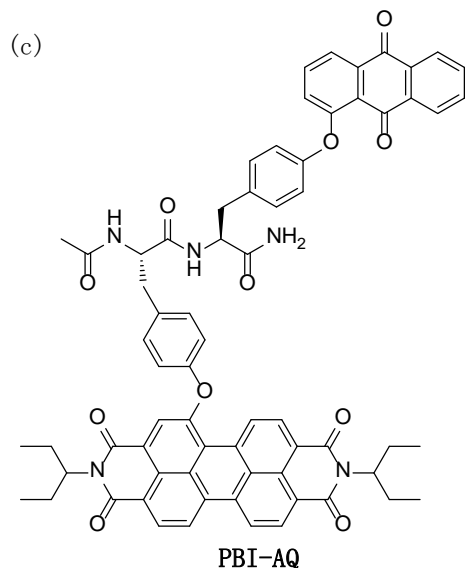


図4 (a) Fmoc-Tyr(PBI)-OHの構造、
(b) Fmoc-Tyr(AQ)-OHの構造、
(c) PBI-AQの構造

ペリレンビスイミド化合物をブロモ化し、これに Boc 基と OBzl 基で保護されたチロシン (Boc-Tyr-OBzl) を反応させ、両者を結合した。次に、OBzl 基を脱保護し、スクシンイミド化 Fmoc (Fmoc-OSu) を反応させることにより、Fmoc 保護されたペリレンビスイミド修飾チロシン (Fmoc-Tyr(PBI)-OH) (図4 (a)) を合成した。一方、1-クロロアントラキノンに対し、Boc-Tyr-OBzl を反応させることで両者を結合した後、Fmoc-OSu を反応させることにより、Fmoc 保護されたアントラキノン修飾チロシン (Fmoc-Tyr(AQ)-OH) (図4 (b)) を得た。上記のようにして得られた蛍光基ユニット Fmoc-Tyr(PBI)-OH と酸化還元ユニット Fmoc-Tyr(AQ)-OH をペプチド固相合成法により結合し、目的とした蛍光プローブ、PBI-AQ (図4 (c)) を合成した。

②PBI-AQの蛍光測定

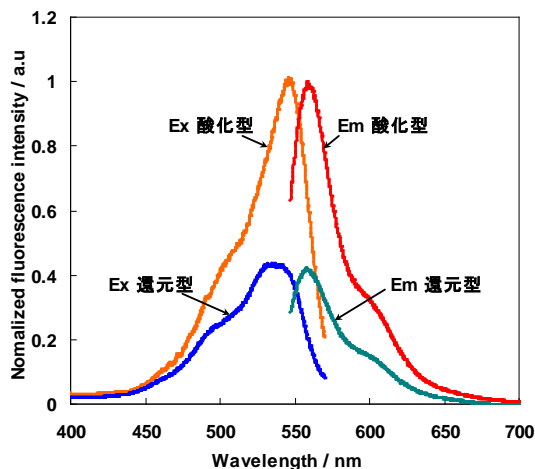


図5 PBI-AQの蛍光スペクトル測定

PBI-AQは、AQ部位の還元によってPBI由来の蛍光が消光すると予想される。そこで、PBI-AQに還元剤であるNaBH₄を添加したところ、62%の蛍光強度の減少が確認され、そのレドックス反応応答性が確認できた (図5)。

③親水性部位の結合によるPBIの水溶化

PBI 蛍光基は、長波長可視光励起が可能であるばかりでなく、蛍光量子収率が極めて高く、光安定性も非常に高いという優れた利点を有している。しかし、疎水性が高いため、水環境下で利用可能な蛍光プローブを作製する際のビルディングブロックとしては、しばしばその応用が限定されてしまう。そこで、今回合成した蛍光基ユニットである Fmoc-Tyr(PBI)-OH に固相ペプチド合成の手法により親水性アミノ酸であるリジン (K)、グルタミン酸 (E)、及び親水性ポリマーであるポリエチレングリコール (PEG) を結合することにより、PBI 蛍光基の水溶化について検討を行った。その結果、蛍光測定において親水性化合物の結合に伴う蛍光強度の増大が確認され、水溶化に有効であることが明らかとなった (図6)。これは、今回開発した PBI-AQ を含め、様々な PBI を利用した蛍光プローブを水溶化する上で、重要な結果であると考えられる。

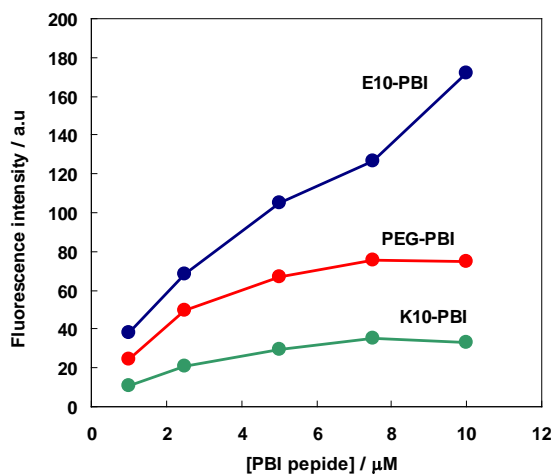


図6 親水性化合物を付加したPBI型蛍光基ユニットの蛍光強度測定

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2件)

- ① Nobuaki Soh, Toshihisa Ueda, "Perylenebisimide as a versatile fluorescent tool for environmental and biological analysis: A review", *Talanta*, **85**, 1233-1237 (2011) [査読有り]

- ② 宗 伸明, “ペリレンビスイミドを用いた分析法”, *ぶんせき*, **10**, 619-620 (2011) [査読有り]

[学会発表] (計 10 件)

- ① Tomoharu Maki, Ryoichi Ishimatsu, Nobuaki Soh, Koji Nakano, Toshihiko Imato “Observation of flow behavior of fluorescence probe in microchannel by using confocal microscopy” Mini-Symposium on Flow Injection Analysis with Professor Gary D. Christian, December 2, 2011, Aichi, Japan
- ② 宗 伸明 “バイオ分析のためのケミカルツール” 2011 年日本化学会西日本大会 平成 23 年 11 月 13 日 徳島県徳島市
- ③ 亀田真吾、久保雄也、宗 伸明、中野幸二、今任稔彦 “細胞内レドックス環境のイメージング計測を指向した酸化還元型蛍光センサーの開発” 2010 年日本化学会西日本大会 2010 年 11 月 7 日 熊本県熊本市
- ④ Nobuaki Soh, “Fluorescent chemical tools for bioanalysis”, Kyushu University Global COE Program “Science for Future Molecular Systems”, The 13th International Workshop, October 29, 2010, Fukuoka, Japan
- ⑤ 亀田真吾、久保雄也、宗 伸明、中野幸二、今任稔彦 “細胞内レドックスの可視化を指向した蛍光プローブの開発” 第 28 回九州分析化学若手の会夏季セミナー 2010 年 7 月 30 日 長崎県南島原市
- ⑥ 亀田真吾、久保雄也、宗 伸明、中野幸二、今任稔彦 “細胞内レドックスの可視化を指向した蛍光プローブの開発” 第 47 回化学関連支部合同九州大会 2010 年 7 月 10 日 福岡県北九州市
- ⑦ Nobuaki Soh, “Development of novel fluorescent probes for monitoring biomolecules”, Research Topics in Biomedical Engineering, ETH Zurich (Fall Semester 2009), November 9, 2009, Zurich, Switzerland
- ⑧ 宗 伸明 “細胞機能解析を指向した小分子蛍光プローブ群の創製と応用” 日本分析化学会第 58 年会 2009 年 9 月 25 日 北海道札幌市
- ⑨ 宗 伸明、牧 知治、有吉知幸、中野幸

二、今任稔彦 “活性酸素種センシング試薬の開発と応用” 東京コンファレンス 2009 2009 年 9 月 4 日 千葉県千葉市

- ⑩ 宗 伸明 “細胞内を探る分子ツール” 第 22 回九州分析化学若手の会春の講演会 2009 年 5 月 23 日 福岡県福岡市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宗 伸明 (SOH NOBUAKI)
佐賀大学・農学部・准教授
研究者番号：90336008

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：

(4) 研究協力者

今任 稔彦 (IMATO TOSHIHIKO)
九州大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号：50117066