

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 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790106

研究課題名（和文） 受容体蛋白質との結合と、外部環境変化の同時検出能を有する蛍光プローブの開発と応用

研究課題名（英文） Development of Novel Fluorescent Probes for the Study of Receptor Localization and Environmental Change

研究代表者

平野 智也（HIRANO TOMOYA）

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・准教授

研究者番号：20396980

研究成果の概要（和文）：測定対象と選択的に結合し、その蛍光が変化する蛍光プローブは、細胞生物学等の基礎研究のみならず、診療等の医学分野においても有用である。本研究ではこうしたプローブ開発を行い、プロゲステロン受容体等の受容体蛋白質、溶媒極性、溶媒の粘性等の外部環境変化を検出するプローブなど、複数のプローブの開発に成功した。これらの改良をさらに進めることにより、ガンなどの特定の疾患組織の検出が可能になると考えている。

研究成果の概要（英文）：Fluorescent sensors, whose fluorescent properties could be changed by each analyte, are especially useful in many field scientific research. In this project, we have developed some sensors for receptor proteins such as progesterone receptors or environmental change. By further optimization of these sensors, fluorescent imaging of cancer cells would be possible.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1900000	570000	2470000
2011年度	1200000	360000	1560000
年度			
年度			
年度			
総計	3100000	930000	4030000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬科学

キーワード：医薬分子機能学・ケミカルバイオロジー・蛍光プローブ・分子イメージング

1. 研究開始当初の背景

生体内の特定の細胞、分子、機能の時空間的な変化を可視化し、画像化する実験手法は「分子イメージング」と呼ばれ、ライフサイエンスの基礎研究のみならず、病態、病因の解明等の医学研究、薬の候補物質の体内動態の解析を通じた創薬研究に大きく貢献している。分子イメージングには、測定対象に対して選択的に結合または反応する化合物に何らかのシグナルを発する分子団を結合させた「分子プローブ」を用いる。分子プローブを生きた細胞、組織、個体に用い、プローブ

ブから発せられるシグナルをリアルタイムに画像として得ることによって、測定対象の濃度、活性等の時空間的な解析が可能となる。

測定対象との結合または反応前後でシグナルが変化するプローブは、高感度なイメージングを可能とする。蛍光を検出のシグナルとするプローブ、すなわち蛍光プローブでは、こうしたシグナルが変化するプローブを比較的容易に開発可能である。そのため、これまでイオン、活性窒素種等を検出する蛍光プローブが種々開発されてきた。ガン等の特定の疾患組織を検出する蛍光プローブを開発

する際には、過剰に発現している受容体蛋白質または、低酸素等の疾患組織特有の外部環境変化を標的とする場合が多い。これまで、一部のガン細胞において過剰発現する受容体型チロシンキナーゼ **HER2** や、**pH**、低酸素等の外部環境変化を標的としたガン細胞プローブが報告されているものの、選択性、感度は十分とは言い難く、新たな原理に基づくプローブの開発が望まれてきた。

2. 研究の目的

本研究は、こうした蛍光プローブの開発および応用を行う。特に蛍光プローブにおける、蛍光特性変化の新たな原理として、「蛍光物質の会合現象の制御」に着目した研究を行う。その概略を図1に示す。

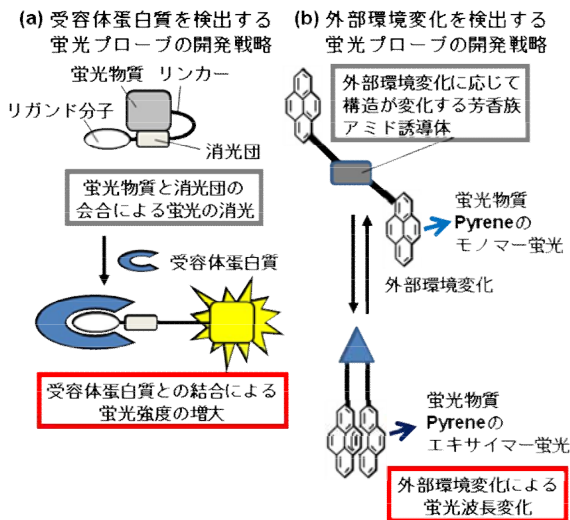


図1 蛍光物質の会合現象の制御を基にした蛍光プローブ開発

受容体蛋白質を検出する蛍光プローブにおいては、蛍光物質と他の分子団（以下、消光団とする）とが、疎水性相互作用等によって分子内で会合し、消光する現象を利用する。リンカーを介して蛍光物質、消光団の適切なペアを結合させた構造に、各受容体蛋白質に対して選択的に結合するリガンド分子を結合させた化合物は、受容体蛋白質との結合によって、消光団近辺の環境変化から、会合が解消することを期待した。すなわち、特定の受容体蛋白質により蛍光強度が変化する蛍光プローブとなりえると考えた（図1a）。また、芳香族アミドの特定の誘導体に見られる、外部環境に応じた構造変換を利用したプローブ開発も行う。こうした誘導体に pyrene 等の蛍光物質二分子を導入した化合物は、構造が **trans** 型をとる際には **pyrene** のモノマー蛍光が検出されるが、構造が **cis** 型をとると **pyrene** 二分子が近接して会合し、蛍光波長がより長いエキサイマー蛍光を発する。す

なわち、外部環境変化を蛍光波長変化によって検出する蛍光プローブとなりえると考えた（図1b）。

さらに別の手法によって、同様の機能を持った蛍光プローブの開発、複数の機能を併せ持つプローブの開発も目指す。

3. 研究の方法

(1) Tricarbocyanine 類、Bodipy 類を蛍光物質として用いた、会合制御型蛍光プローブの開発

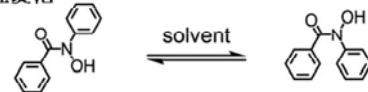
図1aに示した戦略に最適な蛍光物質、消光団の組み合わせの探索を行う。見出された適切な組み合わせに、リガンド分子を導入して、受容体蛋白質に対する蛍光プローブ開発へと展開する。蛍光物質には、生きた個体を用いた *in vivo* イメージングに適用することも意図して、生体組織に対する透過性が高い近赤外光に励起、蛍光波長を持つ Tricarbocyanine 類を用いる。さらに誘導体展開の容易さ、蛍光特性の多様性から、Bodipy 類も蛍光物質として用いる。

リガンド分子としては、蛋白質 Avidin と選択的に結合する Biotin、特定の癌細胞に過剰に発現している Estrogen 受容体に対する内因性リガンド分子である Estradiol を用いて、蛍光プローブへと展開する。

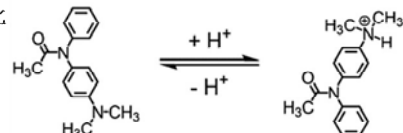
(2) 芳香族アミド誘導体の構造変化を利用した蛍光プローブの開発

芳香族アミドには、図2に示すように、溶媒、pH 変化、酸化還元等の外部環境変化により、その構造が **trans** 型から **cis** 型へと変換する誘導体が存在することが報告されている。そこで、各々のベンゼン環パラ位にリンカーを介して pyrene 分子を導入し、外部環境変化を検出する蛍光プローブへと展開する。

1) 溶媒特性変化



2) pH変化



3) 酸化還元

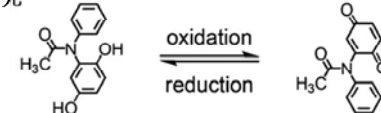


図2 芳香族アミド誘導体の外部環境変化に依存した構造変化

(3) 蛍光物質ライブラリー構築を基にした、
蛍光プローブ開発

近年、特定の生理活性、機能を持った分子を開発するための方法論として、多種類の化合物からなるライブラリーを構築し、望みの機能を持った分子を探索する手法が用いられている。我々はこれまでの研究において、蛍光物質クマリンを母核として、種々の化合物と Suzuki-Miyaura coupling 反応、Huisgen 反応を行うことにより、蛍光物質クマリンのライブラリー構築に成功している。そこで本ライブラリーから、受容体蛋白質に対する蛍光プローブ、外部環境変化に対する蛍光プローブの探索を行う。

4. 研究成果

(1) 研究の方法(1)に記した研究の成果

蛍光物質 Tricarbocyanine 類、Bodipy 類に対して最適な消光団を探索した結果、図3に示す、Dabcyl、Dimethylaminobenzene が、各々、蛍光強度の大きな変化を引き起こす消光団として最適であることを見出した。そこで、リガンド分子として Estradiol を導入した **1**、Biotin を導入した **2** を蛍光プローブとして合成した。

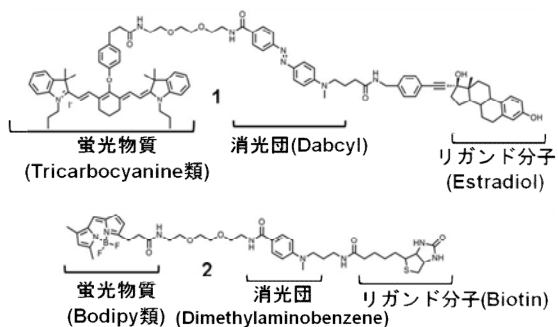


図3 受容体蛋白質に対する蛍光プローブ **1**、**2**

化合物 **1** は、受容体蛋白質である Estrogen 受容体との結合による蛍光強度の変化は小さかったものの、化合物 **2** は Avidin との結合により蛍光強度が大きく増大し、受容体蛋白質に対する蛍光プローブとして機能していることを見出した。

(2) 研究の方法(2)に記した研究の成果

溶媒により構造が変化する芳香族ヒドロキサム酸の各々のベンゼン環のパラ位に、エチレン鎖を介して pyrene 二分子を導入した **3** を合成した (図4)。 **3** は、DMSO、DMF 等の高極性溶媒では trans 型をとり、380 nm 付近のモノマー蛍光のみが検出されたのに対し、クロロホルム (CHCl₃) 等の低極性溶媒においては cis 型をとり、470 nm 付近のエキサイマー蛍光が観測された。すなわち化合物 **3** は、溶

媒という外部環境の変化に応じて構造および、蛍光特性が変化する蛍光プローブとして機能していることを見出した。

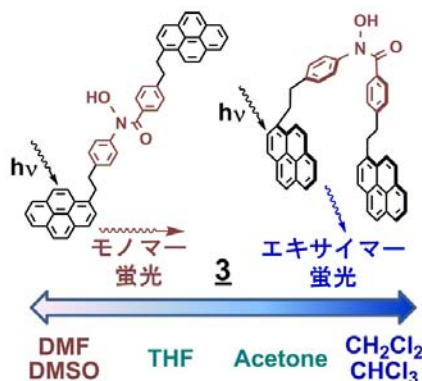


図4 溶媒変化に対する蛍光プローブ **3**

(3) 研究の方法(3)に記した研究の成果

我々はこれまで図5に示すように、蛍光物質クマリンを母核としたライブラリーを構築している。本ライブラリーから、受容体蛋白質に対するリガンド分子の探索を行った。その結果、核内受容体の一つであるプロゲステロン受容体と結合することにより蛍光強度が増大する化合物 **4** を開発することに成功した (図6)。本化合物は、プロゲステロン受容体に対する蛍光プローブとして機能している。

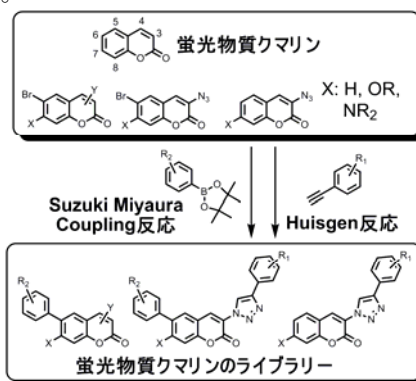


図5 蛍光物質クマリンライブラリー

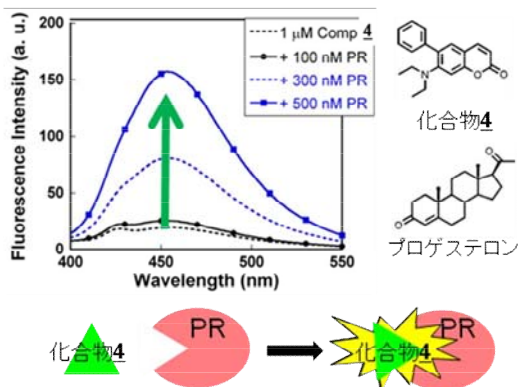


図6 プロゲステロン受容体 (PR) に対する蛍光プローブ **4**

またライブラリーからは、pH 変化、ナトリウムイオンの濃度変化を各々蛍光強度、蛍光波長の変化として一分子で検出可能な Multi Analyte 型蛍光プローブ、溶媒の粘性という外部環境により蛍光波長が変化するプローブを得ることに成功した。

(4) 本研究課題で得られた研究成果の国内外での位置づけとインパクト、及び今後の展望

本研究により、ガン細胞をはじめとする疾患組織の選択的な検出に応用可能な、受容体蛋白質に対する蛍光プローブ、外部環境変化を検出する蛍光プローブを複数得ることに成功した。こうしたプローブ開発は、「蛍光物質の会合現象の制御」および、「蛍光物質ライブラリーの応用」という新たな原理、手法に基づくものであり、従来手法では開発が難しかった測定対象に対するプローブ開発への応用も期待できる。

また開発した個々のプローブの構造要素の解析から、受容体結合と、外部環境変化、という複数の現象を一分子で検出できるプローブの開発も可能となると考えている。こうしたプローブは疾患組織に対し、これまで報告されたプローブと比較して、高い選択性による検出が期待できるため、基礎研究のみならず、医療分野への貢献も期待できる。

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 10 件)

- 1) Taniguchi, K., Takizawa, S., Hirano, T., Murata, S., Kagechika, H., Kishida, A., Ohsaki, A. "Amarastelline A: A Fluorescent Alkaloid from *Quassia amara* and Its Properties in Living Cells" *ChemPlusChem*, in press (DOI: 10.1002/cplu.201200016, Article first published online: 30 MAR 2012).
- 2) Gao, P., Hirano, T., Chen, Z., Yasuhara, T., Nakata, Y., Sugimoto, A. "Isolation and identification of C-19 fatty acids with anti-tumor activity from the spores of *Ganoderma lucidum* (reishi mushroom)" *Fitoterapia*, **83**, 490-499 (2012).
- 3) Kanai, M., Hirano, T. (Corresponding Author), Azumaya, I., Okamoto, I., Kagechika, H., Tanatani, A. "Solvent-dependent conformational and fluorescence change of an *N*-phenylbenzohydroxamic acid derivative bearing two pyrene moieties" *Tetrahedron*, **68**, 2778-2783 (2012).
- 4) Fujii, S., Masuno, H., Taoda, Y., Kano,

A., Wongmayura, A., Nakabayashi, M., Ito, N., Shimizu, M., Kawachi, E., Hirano, T., Endo, Y., Tanatani, A., Kagechika, H. "Boron Cluster-based Development of Potent Nonsteroidal Vitamin D Receptor Ligands: Direct Observation of Hydrophobic Interaction between Protein Surface and Carborane" *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 20933-20941 (2011).

5) Sakai, H., Hirano, T. (Corresponding Author), Mori, S., Fujii, S., Masuno, H., Kinoshita, M., Kagechika, H., Tanatani, A. "6-Arylcoumarins as Novel Non-steroidal Type Progesterone Antagonists: an Example with Receptor Binding-dependent Fluorescence" *J. Med. Chem.* **54**, 7055-7065 (2011).

6) Iwashita, M., Fujii, S., Ito, S., Hirano, T., Kagechika, H. "Efficient and Diversity-Oriented Total Synthesis of Riccardin C and Application to Develop Novel Macrolactam Derivatives" *Tetrahedron*, **67**, 6073-6082 (2011).

7) Mori, S., Iwase, K., Iwanami, N., Tanaka, Y., Kagechika, H., Hirano, T. (Corresponding Author) "Development of Novel Bisubstrate-type Inhibitors of Histone Methyltransferase SET7/9" *Bioorg. Med. Chem.* **18**, 8158-8166 (2010).

8) Hirano, T. (First Author, Corresponding Author), Akiyama, J., Mori, S., Kagechika, H. "Modulation of Intramolecular Heterodimer-induced Fluorescence Quenching of Tricarbocyanine Dye for the Development of Fluorescent Sensor" *Org. Biomol. Chem.* **8**, 5568-5575 (2010).

9) Ito, S., Hirano, T., Sugimoto, A., Kagechika, H., Takechi, S., Yamaguchi, T. "Latent Enamine Functionality of 5-Methyl-2,3-dihydropyrazines" *Chem. Pharm. Bull.* **58**, 922-977 (2010).

10) Hirano, T. (First Author, Corresponding Author) and Kagechika, H. "Thyromimetics: a Review of Recent Reports and Patents (2004 - 2009)" *Exp. Op. Ther. Patents*, **20**, 213-228 (2010).

[学会発表] (計 23 件)

・招待講演等

- 1) 平野智也 「核内受容体の生理作用解析および制御を志向した機能性分子の創製」日本薬学会第 132 年会、奨励賞受賞講演、2012 年 3 月、札幌
- 2) Hirano, T. "Facile Method for the Development of Various Fluorescent Sensors" PACIFICHEM 2010, December 2010, Hawaii, USA.

・一般発表

- 1) 白石拓也、久保晴子、廣元健一、影近弘之、平野智也「クマリンを基本骨格とする Multi Analyte 型蛍光センサーの開発」日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月、札幌
- 2) 高口明日香、森修一、平野智也、影近弘之「リジンとメチル化リジンの S_NAr 反応における反応性の検討」日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月、札幌
- 3) 小林周作、久保晴子、小出亜希子、平野智也、影近弘之「オルトジアルデヒド基を持つ蛍光物質の反応性および蛍光特性の解析と生理機能解析への応用」日本化学会第 92 春季年会、2012 年 3 月、横浜
- 4) Hirano T., Sakai H., Mori S., Fujii S., Masuno H., Kinoshita M., Tanatani A., Kagechika H. “Development of Fluorescent Ligands for Nuclear Hormone Receptor” The 1st HD Physiology International Symposium: Integrative Multi-level Systems Biology for In silico Cardiology and Pharmacokinetics, January 2012, Tokyo, Japan
- 5) Hirano T., Shiraishi T., Kubo H., Hiromoto K., and Kagechika H., “Facile Method for the Development of Various Fluorescent Sensors Based on the Construction of Coumarin Compound Library” AIMECS11, December 2011, Tokyo, Japan.
- 6) Mori S., Iwase K., Iwanami N., Tanaka Y., Kagechika H., and Hirano T., “Development of Novel Bisubstrate-Type Inhibitor of Histone Methyltransferase SET7/9” AIMECS11, December 2011, Tokyo, Japan.
- 7) Kinoshita M., Mori S., Hirano T., Fujii S., Masuno H., Sakai H., Kagechika H., and Tanatani A., “Development of Novel Coumarin Derivatives as Progesterone Receptor Antagonists” AIMECS11, December 2011, Tokyo, Japan.
- 8) 大崎愛弓、谷口香織、滝沢進也、平野智也、村田滋、影近弘之、岸田晶夫「熱帯産薬用植物 *Quassia amara* 由来の新規蛍光物質の構造と生細胞への適用」第 53 回天然有機化合物討論会、2011 年 9 月、大阪
- 9) 金井美紗衣、平野智也、東屋功、岡本巖、影近弘之、棚谷綾「環境応答型アミドの立体特性を基盤とした蛍光センサー分子の創製」第 22 回基礎有機化学討論会、2011 年 9 月、つくば
- 10) 平野智也、岩瀬健太、森修一、岩浪直子、田中裕二郎、影近弘之「補酵素構造を基にした、ヒストンメチル化酵素 SET7/9 に対する bisubstrate 型阻害剤の開発」第 5 回バイオ関連化学シンポジウム、2011 年 9 月、つくば
- 11) 藤原敬士、秋山淳、影近弘之、平野智也「会合現象制御を利用した蛍光センサーの開発」、日本分析化学会第 60 年会、2011 年 9 月、名古屋
- 12) 白石拓也、久保晴子、廣本健一、影近弘之、平野智也「クマリンを基本骨格とする多機能性蛍光センサーの効率的な開発法の構築」、日本分析化学会第 60 年会、2011 年 9 月、名古屋
- 13) 藤原敬士、秋山淳、平野智也、影近弘之「蛍光物質の会合現象の解析と、リガンド分子の蛍光ラベル化への応用」、日本化学会関東支部第 5 回支部大会、2011 年 8 月、東京
- 14) 白石拓也、久保晴子、廣本健一、平野智也、影近弘之、「クマリンを基本骨格とする蛍光センサーの開発研究」日本ケミカルバイオロジー学会第 6 回年会、2011 年 5 月、東京
- 15) 藤原敬士、平野智也、影近弘之「BODIPY 類の会合現象制御を利用した蛍光センサーの開発研究」、日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月、静岡
- 16) 白石拓也、久保晴子、廣本健一、平野智也、影近弘之、「クマリンを基本骨格とする蛍光センサーの開発研究」日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月、静岡
- 17) 谷口香織、小沢正晃、滝沢進也、村田滋、平野智也、影近弘之、岸田晶夫、大崎愛弓「*Quassia amara* 由来の新規蛍光分子の構造と生細胞への適用」、日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月、静岡
- 18) 平野智也、秋山淳、藤原敬士、影近弘之「Tricarbocyanine 類の分子内会合現象制御を利用した蛍光センサー開発」、日本化学会第 91 春季年会、2011 年 3 月、横浜
- 19) 金井美紗衣、平野智也、榊飛雄真、片桐幸輔、東屋功、影近弘之、棚谷綾「環境応答型アミドの特性を基盤とした蛍光センサー分子の開発」、日本化学会第 91 春季年会、2011 年 3 月、横浜
- 20) 金井美紗衣、平野智也、榊飛雄真、東屋功、影近弘之、棚谷綾「環境応答型アミドの構造特性を利用した蛍光センサー分子の開発」、第 36 回反応と合成の進歩シンポジウム、2010 年 11 月、名古屋
- 21) 平野智也、酒井悠、白石拓也、森修一、藤井晋也、棚谷綾、影近弘之「クマリン骨格を基盤とした蛍光センサーの効率的開発法の構築と、蛍光性プロゲステロン受容体リガンド開発への応用」、第 4 回バイオ関連化学シンポジウム、2010 年 9 月、大阪

〔図書〕(計 2 件)

- 1) Sutton, R., Rockett, B. and Swindells, P. 著、影近弘之、平野智也 訳「ライフサイエンスのための基礎化学」東京化学同人 (2011).
- 2) 斎藤隆夫監修、執筆者平野智也ら 38 名、「化学事典」、旺文社 (2010)

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計1件）

名称：プロゲステロン受容体拮抗剤

発明者：棚谷綾、酒井悠、影近弘之、平野智也

権利者：国立大学法人東京医科歯科大学、国立大学法人お茶の水女子大学

種類：特許権

番号：特開 2011-178695

取得年月日：2011年9月15日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/mri/omc/index1.htm>

1

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平野智也 (HIRANO TOMOYA)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・

准教授

研究者番号：20396980