

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590005

研究課題名(和文) 蛍光物質ライブラリーの構築及びその合成法を基にした、高機能蛍光センサーの開発

研究課題名(英文) Development of fluorescent sensors based on the construction of fluorescent compounds library

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：測定対象を蛍光変化により検出する蛍光センサーは、様々な分野の研究に用いられている。我々は多数の蛍光物質から成るライブラリーを構築し、望みの機能を持つセンサーを探索および誘導体化による最適化という手法によって開発する研究を行った。その結果、pH6付近の環境を選択的に検出するセンサー、粘性の変化を蛍光波長変化によって検出するセンサー等の、環境変化を検出するセンサー群の開発に成功した。更に、酵素による反応や生体内で起こる選択的な結合反応により、その機能が制御されるセンサーの開発にも成功した。こうしたセンサーは、生理機能解析だけでなく疾患の診断にも用いることが可能な有用な分子群である。

研究成果の概要(英文)：Fluorescent sensors, whose fluorescence properties are changed by each analyte, have been utilized in scientific research. For development of such sensors, we have constructed a library of fluorescent compounds. From this library, sensor for the change of pH was developed, based on a structure containing two hydroxyl groups that are sequentially deprotonated as the pH increases: the first deprotonation increases the fluorescence intensity and the second decreases it. Compared with most reported pH sensors that can detect only whether the pH is below or above a specific value, our sensor could detect a specific range of pH. In addition, viscosity sensor, whose fluorescent maximum wavelength was sifted by the change of solvent viscosity, was also obtained. We also developed the sensors for metal cations like zinc or sodium ion, whose functions could be regulated by enzymatic reaction. Those sensors should be useful for the elucidation of physiological function and medical diagnosis.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：有機化学 分析科学 薬学 蛍光 分子イメージング

1. 研究開始当初の背景

生体内に存在するイオン、活性酸素種などの分子種、または溶媒の極性などの外部環境の変化によって、蛍光強度、蛍光波長などの蛍光特性が変化する蛍光センサーは、分析化学のみならず、細胞生物学の研究においても必須の分子ツールとして定着している。我々はこうした蛍光センサー開発のための方法論として、蛍光物質のライブラリー構築を基にした開発法を提唱してきた。すなわち、図1に示すように、蛍光物質クマリンにプロモ基、アジド基を導入した化合物群 **1** を原料として、ボロン酸誘導体群 **2** との間で鈴木-宮浦カップリング反応、アセチレン誘導体群 **3** との間でヒュースゲン反応を行い、蛍光物質クマリンのライブラリーを構築する。ライブラリーおよびその合成法から、蛍光強度変化型一酸化窒素蛍光センサー **4** や、蛍光波長変化型ナトリウムイオン蛍光センサー **5**、ナトリウムイオンを蛍光波長の変化により、プロトン蛍光強度の変化によって検出する蛍光センサー **6** 等の、任意の測定対象に対し、望みの蛍光特性の変化を引き起こす蛍光センサーを効率的に開発できることを示した。さらにリガンド依存性転写制御因子であるプロゲステロン受容体と選択的に結合し、蛍光強度が増大する蛍光性リガンド分子 **7** の開発にも成功していた。

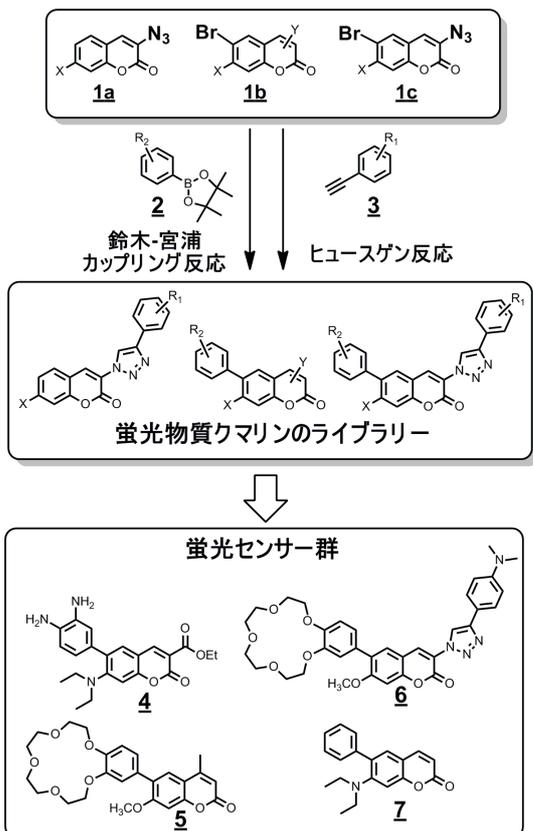


図1 本研究開始当初における研究成果

こうしたセンサー群を得ることを可能とした本手法は有用であるものの、得られたセンサーの機能は未だ限定的であり、特に従来

の手法では開発できなかった、新規性の高いセンサーを得る等の画期的な成果を得るには至っていなかった。

2. 研究の目的

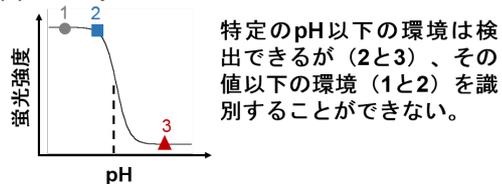
先に述べた研究経過を踏まえて本研究では、環境変化を検出する蛍光センサー等の、従来の論理的な分子デザイン法では開発が難しい分子を、構築した蛍光物質ライブラリーを基に開発することを目指す。また、見いだされた分子の機能を解析し、適切な誘導体化を行うことによって、更に高機能のセンサーへと展開する。こうしたセンサーは、細胞情報伝達機構の解析のみならず、疾患の診断に用いる検査薬等にも用いることができる有用な分子となる。

3. 研究の方法

(1) 特定の pH 領域を検出する蛍光センサーの開発

生体内の pH は厳密に制御されている。例えば細胞質中の pH は通常 7.2 であるが、細胞外 pH は pH 7.4 に調整されている。細胞内小器官においてはリソソーム、ライソソームの内部は pH 4.5 ~ 5.5 と弱酸性であるのに対し、ミトコンドリア内は pH 7.9 と弱アルカリ性である。こうした環境は正常な生理機能発現に必要な一方、疾患状態となった組織においては変化することが多い。例えば、一部のがん化した組織においては細胞外 pH が約 6.5 と弱酸性になることが報告されている。

(a) 従来の pH センサー



(b) 本研究で開発を目指す pH センサー

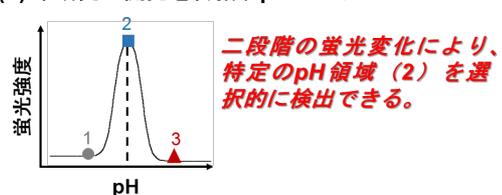


図2 pH センサーの機能の模式図

こうした pH 変化を検出する蛍光センサーには、SNARF-1 等の有機小分子の蛍光センサーに加えて、プロトン化により構造が変化するナノ粒子を用いたセンサーがこれまでに開発されている。これらのセンサーは、一定の値の pH 以上もしくは以下によって蛍光が変化する機能を有する(図 2a)。そのため、例えば pH 6.5 以下の環境を検出することはできるものの、pH 6.5 と pH 5 の環境を識別することができないという問題があった。こ

れに対して特定の pH 領域でのみ蛍光強度が増大するセンサー(図 2b)は、これらの問題を解決した有用な分子となりえる。本研究では、構築した蛍光物質のライブラリーを基に、こうした特定の pH 領域を検出するセンサーの開発を行う。

(2) 細胞膜局在型粘性センサーの開発

細胞膜の粘性は膜蛋白質の機能に影響を与えることによって、生理機能に関与している。さらに、循環器系の疾患、アルツハイマー病、糖尿病等においては粘性が正常状態と比較して変化することも報告されている。本研究では、こうした粘性変化を検出するセンサーを構築したライブラリーを基に開発する。特に、より正確な測定を可能とする蛍光波長変化型のセンサーの開発を目指す。開発したセンサーは誘導体化により、細胞膜に局在する機能を付与した分子へと展開する。

(3) 特定の酵素反応により機能が制御される蛍光センサーの開発

酵素による反応や、生理的な条件下での選択的な結合反応による官能基変換によって、センサーとしての性質が変化する分子の開発を行う(図 3)。蛍光物質群の官能基の変化と蛍光センサーとしての機能の相関を解析することによって、こうしたセンサーの開発を目指す。

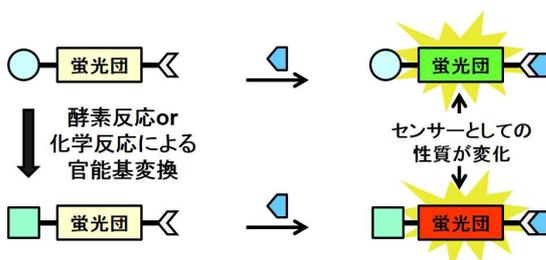


図 3 官能基変換により機能が変化するセンサー

(4) 蛍光性天然物を基にした蛍光センサーの開発

新たな蛍光物質のソースとして、植物等に由来する天然物を利用することとし、得られた蛍光性天然物を基にした蛍光センサーの開発を行う。

4. 研究成果

「(1) 特定の pH 領域を検出する蛍光センサーの開発」における研究成果

構築した蛍光物質のライブラリーの中から水酸基、アミノ基等の pH 変化によりプロトン化、脱プロトン化が起こる官能基を複数持つ化合物群を中心に、酸性、中性、塩基性条件下における蛍光特性の解析を行った。その結果、中性条件下でのみ蛍光強度が増大する化合物 **8** を得た(図 4)。**8** の機能を詳細に解析したところ、図 4 に示すように pH8~10

という領域において特に強い蛍光を持つことが示され、図 2b に示した機能を持つ、有用なセンサーであることが明らかとなった(5. 主な発表論文等、雑誌論文、原著論文の 1)。

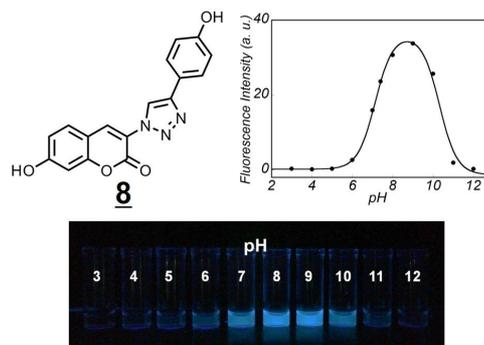


図 4 特定の pH 領域を検出するセンサー

また、化合物 **8** の誘導体展開を行い、蛍光強度が増大する pH 領域が、各々 pH6、pH 8 付近という、より狭い pH 領域選択的に蛍光強度が増大するセンサー **9**、**10** の開発にも成功した(図 5)。

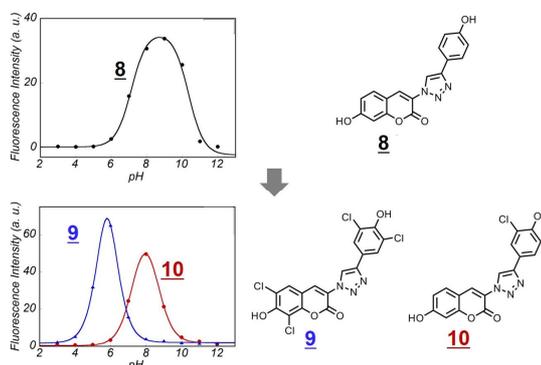


図 5 検出する pH 領域の最適化

さらに蛍光団をキサンテンへと変換し、異なる波長の蛍光の、同様の pH 領域検出能を持つセンサーの開発にも成功した。こうしたセンサー群は、ガン等の疾患組織選択的なイメージングや、pH が段階的に変化するエンドサイトーシス過程の可視化解析等に用いることができる有用な分子である。

「(2) 細胞膜局在型粘性センサーの開発」における研究成果

粘性が変化する溶媒系である、エチレングリコールとグリセロールの比率を変化させた各溶液中での、ライブラリーの各化合物の蛍光スペクトルの解析を行った。その結果、化合物 **11** が粘性の減少に伴い、490 nm 付近の蛍光強度が増大するという結果が得られた(図 6)。これまで報告されている粘性変化を検出するセンサーのほとんどは蛍光強度変化が起こる分子であったが、本分子は蛍光波長が変化する、すなわち二波長の蛍光強度の比により粘性の変化を検出できる機能を有していた。こうした分子は、センサーの濃

度変化や蛍光退色等による影響を受けず、正確な測定を可能とする有用な分子となる。

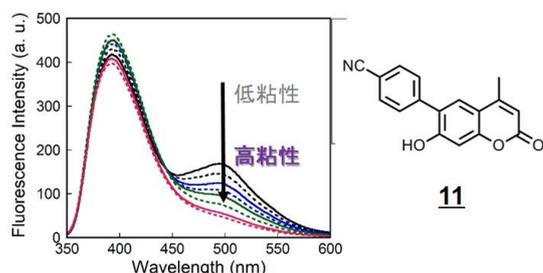


図6 粘性変化を検出する蛍光センサー11

また 11 に細胞膜への集積能があるファルネシル基を導入し、細胞膜の粘性変化を選択的に検出する機能を付与した誘導体の合成にも成功した。本センサーは、細胞膜の粘性が変化する循環器系の疾患の検出等に用いることが可能な有用な分子となる。

「(3) 特定の酵素反応により機能が制御される蛍光センサーの開発」における研究成果

蛍光物質群の蛍光特性を検討した結果、図7に構造を示す、酵素反応等の生理的な条件下で起こる反応により機能が制御されるセンサーの開発に成功した。

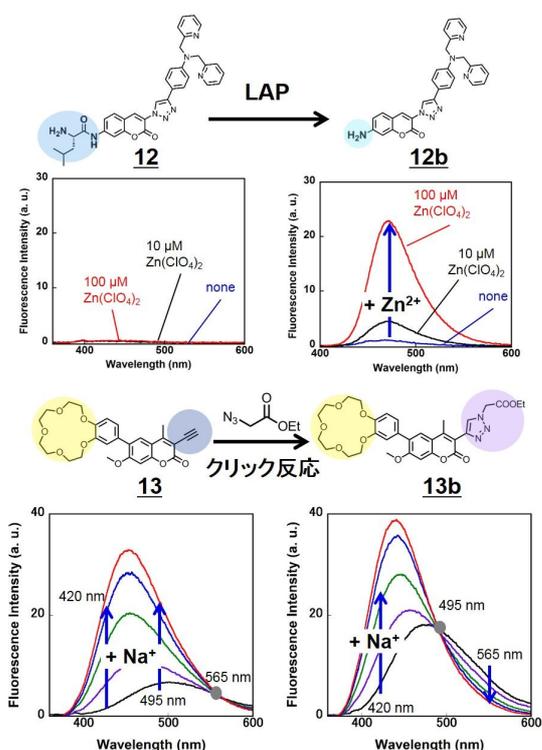


図7 酵素反応等による機能制御が可能なセンサーの例

化合物 12 は測定対象である亜鉛イオンを添加しても蛍光強度は弱いですが、ロイシンアミノペプチダーゼ (LAP) による酵素反応を受けて化合物 12b へと変換されると亜鉛イオンを検出するセンサーとなる。化合物 12 は、アジド基とのクリック反応により、測定対象

であるナトリウムイオン添加前後の蛍光波長が変化するセンサーである。

これらの分子は、特定の酵素活性が亢進しているガン細胞や、細胞内小器官に局限した生体内分子の濃度変化解析等への応用が可能である。

「(4) 蛍光性天然物を基にした蛍光センサーの開発」における研究成果

ニガキ科の植物 *Quassia amara* から蛍光性天然物アマラステリン A を得ることに成功した。アマラステリン A は、HeLa 細胞、PC12 細胞に用いると、核が染色されず、細胞質のみを長時間蛍光染色が可能であるという有用な機能を有していた (5. 主な発表論文等、雑誌論文、原著論文の 7)。また、同じくニガキ科の植物から見出されたニガキノククロホルム溶液中 370 nm で励起すると、430 nm に加えて 610 nm という長波長に蛍光を持つ等の興味深い機能を有していることを明らかにした。さらに、これらの蛍光性天然物の誘導体群を合成し、その蛍光特性および機能を比較、検討した結果、蛍光を発するために必須な構造要素に関する知見を得た。また独特の蛍光特性を持つ新規蛍光物質を得ることに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

原著論文 (全て査読あり)

- Shinya Fujii, Ryota Sekine, Atsushi Kano, Hiroyuki Masuno, Chalermkiat Songkram, Emiko Kawachi, **Tomoya Hirano**, Aya Tanatani, Hiroyuki Kagechika. Structural development of p-carborane-based potent non-secosteroidal vitamin D analogs. *Bioorg Med Chem.* 22, 5891-901 (2014). DOI: 10.1016/j.bmc.2014.09.020
- Takuya Shiraishi, Toshiki Saito, Hiroyuki Kagechika, **Tomoya Hirano** "Development of a Novel Fluorescent Sensor to Detect a Specific Range of pH" *Tetrahedron Lett.*, 55, 6784-6786 (2014). DOI: 10.1016/j.tetlet.2014.10.037
- Shinya Fujii, Atsushi Kano, Hiroyuki Masuno, Chalermkiat Songkram, Emiko Kawachi, **Tomoya Hirano**, Aya Tanatani, Hiroyuki Kagechika, "Design and synthesis of tetraol derivatives of 1,12-dicarba-*closo*-dodecaborane as non-secosteroidal vitamin D analogs" *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 24, 4515-4519 (2014). DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.07.075
- Shinya Fujii, Atsushi Kano, Chalermkiat Songkram, Hiroyuki Masuno, Yoshiyuki Taoda, Emiko Kawachi, **Tomoya Hirano**, Aya Tanatani, Hiroyuki Kagechika, "Synthesis and

- structure-activity relationship of *p*-carborane-based non-secosteroidal vitamin D analogs” *Bioorg. Med. Chem.*, **22**, 1227-1235 (2014). DOI: 10.1016/j.bmc.2014.01.015
- 5) Hideaki Niwa, Noriko Handa, Yuri Tomabechi, Keiko Honda, Mitsutoshi Toyama, Noboru Ohsawa, Mikako Shirouzu, Hiroyuki Kagechika, **Tomoya Hirano**, Takashi Umehara, Shigeyuki Yokoyama “Structures of histone methyltransferase SET7/9 in complexes with adenosylmethionine derivatives” *Acta Crystallogr. Sect. D*, **69**, 595-602 (2013). DOI:10.1107/S0907444912052092
- 6) **Tomoya Hirano**, Haruko Kubo, Takuya Shiraiishi, Kenichi Hiromoto, Takashi Fujiwara, Hiroyuki Kagechika “Fluorescent Properties of Coumarins with Dual Functions Constructed by Two Sequential Reactions” *Tetrahedron Lett.* **53**, 5916-5919 (2012). DOI: 10.1016/j.tetlet.2012.08.085
- 7) Kaori Taniguchi, Shinya Takizawa, **Tomoya Hirano**, Shigeru Murata, Hiroyuki Kagechika, Akio Kishida, Ayumi Ohsaki “Amarastelline A: A Fluorescent Alkaloid from *Quassia amara* and Its Properties in Living Cells” *ChemPlusChem*, **77**, 427-431 (2012). DOI: 10.1002/cplu.201200016
- 総説 (全て査読あり)
- 1) 藤井晋也, 棚谷綾, **平野智也**, 影近弘之 “球状疎水性ファーマコフォアを有する非セコステロイド型 VDR リガンドの創製研究” *Vitamins (Japan)*, **88**, 389-395 (2014).
- 2) **Tomoya Hirano** “Development of Functional Molecules for Elucidation of the Physiological Roles of Several Nuclear Receptors and Their Endogenous Ligands” *Chem. Pharm. Bull.*, **61**, 111-120 (2013). DOI: 10.1248/cpb.c12-00980

[学会発表] (計 44 件)

招待講演

- 1) **Hirano, T.** “Development of Various Fluorescent Sensors Based on the Construction of Fluorescent Compound Library” CCS-CSJ Joint Symposium, August 5, 2014, Beijing, China.
- 2) **平野智也** “蛍光物質ライブラリーおよびその構築法を基にした多機能性蛍光センサー群の開発” 新学術領域天然物ケミカルバイオロジー・地区ミニシンポジウム “ケミカルバイオロジーのための可視化技術”, 2013年9月7日、東京
- 3) **平野智也** “蛍光物質ライブラリーおよび

- その構築法を基にした蛍光センサー開発” 新学術領域ナノメディシン分子科学セミナー “高精度分子イメージングで拓く医学新領域”, 2013年6月11日、東京
- 4) **平野智也** “補酵素構造を基にしたヒストンメチル化酵素阻害剤の開発” 日本薬学会第133年会、2013年3月29日、横浜一般発表 (主要なもののみ記載)
- 1) 白石拓也, **平野智也**, 齋藤俊樹, 影近弘之, 特定の酵素により機能が制御されるカチオン蛍光センサーの開発、日本薬学会第135年会、2015年3月27日、兵庫
- 2) 野地優希, **平野智也**, 齋藤俊樹, 白石拓也, 影近弘之, 様々な pH 領域を検出する蛍光センサー群の開発、日本薬学会第135年会、2015年3月27日、兵庫
- 3) 藤原敬士, 高口明日香, 森修一, **平野智也**, 影近弘之, ヒストンメチル化酵素活性評価系の開発研究、日本薬学会第135年会、2015年3月27日、兵庫
- 4) **Hirano, T.**, Shiraiishi, T., Saito, T., Kagechika, H. Development of Fluorescent Sensors with its Functions Regulated by Chemical or Enzymatic Reaction, 3rd Annual Conference of the International Chemical Biology Society, San Francisco, USA, November 17, 2014.
- 5) 白石拓也, 齋藤俊樹, **平野智也**, 影近弘之. 官能基変換により機能制御可能な蛍光センサーの開発. 第58回日本薬学会関東支部大会, 東京, 2014年10月4日.
- 6) **平野智也**, 白石拓也, 齋藤俊樹, 影近弘之. 蛍光物質ライブラリーおよびその構築法を基にした多機能性蛍光センサー群の開発. 第8回バイオ関連化学シンポジウム, 岡山, 2014年9月12日.
- 7) **平野智也**, 白石拓也, 齋藤俊樹, 影近弘之, 蛍光物質ライブラリー構築を基にした蛍光センサー群の開発、日本ケミカルバイオロジー学会第9回年会、2014年6月12日、大阪
- 8) 藤原敬士, **平野智也**, 大平香澄, 伊藤昭博, 吉田稔, 影近弘之, ヒストンメチル化酵素 Set7/9 阻害剤の開発研究、日本ケミカルバイオロジー学会第9回年会、2014年6月12日、大阪
- 9) 藤原敬士, 高口明日香, 森修一, **平野智也**, 影近弘之, ヒストンメチル化酵素活性評価系の開発研究. 日本化学会第94春季年会、2014年3月28日、名古屋
- 10) 白石拓也, **平野智也**, 藤原敬士, 影近弘之, エストロゲン受容体の多様な生理作用解析のための蛍光性リガンド分子の開発. 日本薬学会第134年会、2014年3月28日、熊本
- 11) 齋藤俊樹, 白石拓也, **平野智也**, 影近弘之. Click 反応等の官能基変換により機能が変化する蛍光センサーの開発. 日本薬学会第134年会、2014年3月28日、熊

- 本
- 12) 齊藤俊樹, 白石拓也, 長谷川翔平, **平野智也**, 影近弘之. 官能基変換により機能制御が可能な蛍光センサーの開発. 第3回 CSJ 化学フェスタ 2013, 東京, 2013年10月22日.
 - 13) **平野智也**, 小林周作, 影近弘之. 結合反応性を有する補酵素誘導体の開発と酵素機能解析への応用. 第7回バイオ関連化学シンポジウム, 名古屋, 2013年9月28日.
 - 14) 藤原敬士, 高口明日香, 森修一, **平野智也**, 影近弘之. ヒストンメチル化酵素活性評価系の構築を目指した反応剤の開発. 第24回日本レチノイド研究会学術集会, 東京, 2013年8月30日.
 - 15) 藤原敬士, 高口明日香, 森修一, **平野智也**, 影近弘之. 「S_NAr 反応を利用したリジン・メチル化リジンの識別」日本ケミカルバイオロジー学会第8回年会, 2013年6月20日, 東京
 - 16) 白石拓也, **平野智也**, 齋藤俊樹, 影近弘之. 「置換基および認識部位の導入位置の組み合わせによる蛍光センサー機能の多様化」日本ケミカルバイオロジー学会第8回年会, 2013年6月20日, 東京
 - 17) **平野智也**, 能城静香, 影近弘之. 「反応団の最適化による高選択的活性素種蛍光センサーの開発研究」日本薬学会第133年会, 2013年3月28日, 神奈川
 - 18) 高口明日香, 森修一, **平野智也**, 影近弘之. 「S_NAr 反応を利用したリジン・メチル化リジンの識別」日本薬学会第133年会, 2013年3月28日, 神奈川
 - 19) 白石拓也, 中亮人, **平野智也**, 影近弘之. 「蛍光特性変化の様式を制御可能な新規蛍光センサー群の開発」日本化学会第93春季年会, 2013年3月22日, 滋賀
 - 20) **Hirano, T.**, Shiraishi, T., Sakai, H., Kinoshita, M., Tanatani, A., Kagechika, H. Development of Various Functional Fluorescent Molecules Based on the Construction of Coumarin Library. The 1st International Symposium on Biofunctional Chemistry (ISBS2012), Tokyo, November 28, 2012.
 - 21) **Hirano, T.**, Fujii, S., Mori, S., Tanatani, A., Kagechika, H. Development of Various Functional Molecules Based on Hydrophobic and Fluorescent Scaffolds. The 1st Official Conference of the International Chemical Biology Society (ICBS2012), Boston, USA, October 4, 2012.
 - 22) 白石拓也, **平野智也**, 久保晴子, 廣元健一, 影近弘之. 「クマリンライブラリー構築を基にした多様な蛍光センサーの開発研究」日本分析学会第61年会, 金沢, 2012年9月19日
 - 23) 能城静香, **平野智也**, 影近弘之. 「種々の

- 銅錯体構造を用いた活性素種蛍光センサーの開発研究」日本分析学会第61年会, 金沢, 2012年9月19日
- 24) **Hirano, T.**, Sakai, H., Kinoshita, M., Mori, S., Fujii, S., Masuno, H., Kagechika, H., Tanatani, A. "Development of fluorescent progesterone receptor ligand based on coumarin scaffold." 244th ACS National Meeting, Philadelphia, USA, August 22, 2012.
 - 25) Shiraishi, T., **Hirano, T.**, Kubo, H., Hiromoto, K., Kagechika, H. Development of various fluorescent sensors based on coumarin utilizing two orthogonal reactions. 244th ACS National Meeting, Philadelphia, USA, August 19, 2012.
 - 26) **Hirano, T.**, Shiraishi, T., Kubo, H., Hiromoto, K., Kagechika, H. Facile method for development of various fluorescent sensors based on coumarin scaffold. 13th Tetrahedron symposium, Amsterdam, The Netherlands, June 27, 2012.
 - 27) Fujiwara, T., Akiyama, J., **Hirano, T.**, Kagechika, H. "Development of fluorescence activatable ligand based on the modulation of intramolecular heterodimer formation of fluorophore." 13th Tetrahedron symposium, Amsterdam, The Netherlands, June 27, 2012.

[その他]

- ・ホームページ
<http://www.tmd.ac.jp/mri/omc/index1.html>
- ・受賞
平成24年度日本薬学会奨励賞
「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」
- ・報道発表
平成24年6月1日発刊、ファルマシア vol. 48、No. 6、p565、
「奨励賞受賞 平野智也氏の業績」

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