

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25288079

研究課題名(和文) 新しいセンシング機構を組み込んだ蛍光プローブの生体機能解析応用

研究課題名(英文) Bio-analytical Application of Fluorescent Probes Incorporated with a New Sensing Mechanism

研究代表者

王子田 彰夫(Ojida, Akio)

九州大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：10343328

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、金属イオンと蛍光色素がファンデルワールス半径内で直接的に接触することによって生じる蛍光の長波長シフト現象であるAMコンタクト(Arene-Metal ion contact shift)を利用した様々な生体機能解析を目指した。検討の結果、カドミウム錯体を利用して生理活性ガスである硫化水素の蛍光レシオ検出に成功した。また、環状リガンドを有する蛍光色素を新たにデザインすることで銀イオンの選択的蛍光レシオ検出や、これまでに困難であったイオン半径の小さな遷移金属である亜鉛イオンの蛍光レシオ検出にも成功した。

研究成果の概要(英文)：This research focused on the bio-analytical application of the fluorescent probes by exploiting the AM-contact (arena-metal ion) emission shift, which is induced by the direct contact between metal ion and fluorophore within their Van-der Waals radii. In this research we successfully applied a cadmium ion complex to the ratiometric detection of hydrogen sulfide, an bioactive gas, in living cells. We also designed the fluorescent probes appended with a cyclic ligand, which selectively shows a large emission shift upon binding with silver ion. We also successfully applied AM-contact sensing to the ratiometric detection of zinc ion by the elaborated design of the metal binding unit.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：蛍光プローブ センシング 金属イオン バイオイメージング

1. 研究開始当初の背景

生体分子の機能を生きた細胞内において解明する蛍光バイオイメージングをはじめとする様々な *in cell* 解析技術は、分子レベルでの生命機能の解明にこれまでに大きく貢献してきた。In cell 解析技術を駆使して、未知の生命現象の解明するためには、新しい蛍光プローブ開発が重要である。例えば、これまでにカルシウムイオンや活性酸素種(ROS)などの生体分子種を検出可能な蛍光プローブ開発が、精力的に行われ、細胞機構を解明する分子ツールとしてすでに実用化がなされている。これらの蛍光プローブの分子設計は基本的に、検出対象を補足あるいは反応するためのバインディングモチーフと、それらのイベントを蛍光シグナルへと変換するセンシングモチーフを蛍光団に組み込むことによって行われる。バインディングモチーフについては、これまでの超分子化学、錯体化学などの発展により、検出対象の特性に基づいた自由なデザインが可能であり多様性に富んでいる。一方で、センシングモチーフについては、バラエティに富んでいるとは言い難く、例えば、PET (photo-induced electron transfer), ICT (intramolecular charge transfer), FRET (fluorescence resonance energy transfer) などのいくつかの限られた代表的なセンシング機構を利用して蛍光プローブの分子設計をデザインすることが現状である。蛍光波長の変化を伴う二波長レシオ変化の蛍光センシングは、細胞イメージングなどにおいて定量的な解析を可能にするため有用であるが、この機構を小分子型の蛍光プローブに組み込むことは容易ではない。

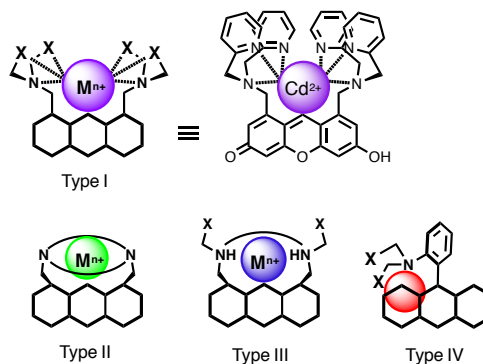
2. 研究の目的

本研究の目的は、金属イオンの持つ特有の機能を活用した新たな蛍光センシング機構の確立と、この機構を組み込んだ金属錯体型蛍光プローブの開発による様々な生理活性物質の蛍光センシングの実現である。これまでに申請者は、蛍光色素が金属イオンと van der Waals 半径内において直接的に接触することにより蛍光波長の長波長化が引き起こされる新たな蛍光センシング機構として AM コンタクト (arene-metal ion contact) を見出した。本研究では、AM コンタクト機構を有する蛍光プローブを開発し、様々な金属イオンあるいは生理活性物質を蛍光波長変化によりセンシングすることを目標とする。

3. 研究の方法

これまでの研究でわかっている AM コンタクト機構により蛍光変化を生じる type I のプローブと同時に、異なる分子設計に基づいた蛍光プローブ type II ~IV を合成し、それらの金属イオンに対する蛍光応答能や、それらの蛍光プローブの金属錯体の生理活性物質に対する蛍光応答能について評価した。さらに蛍光イメージングにより、細胞系における蛍

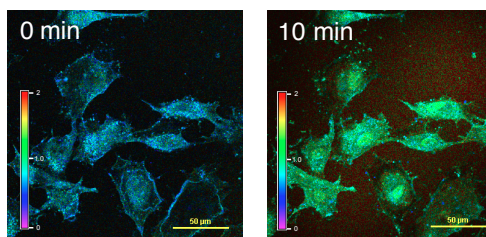
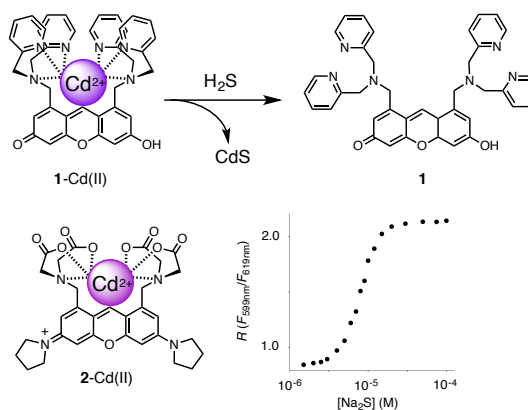
光プローブのセンシング能についても評価を行った。



4. 研究成果

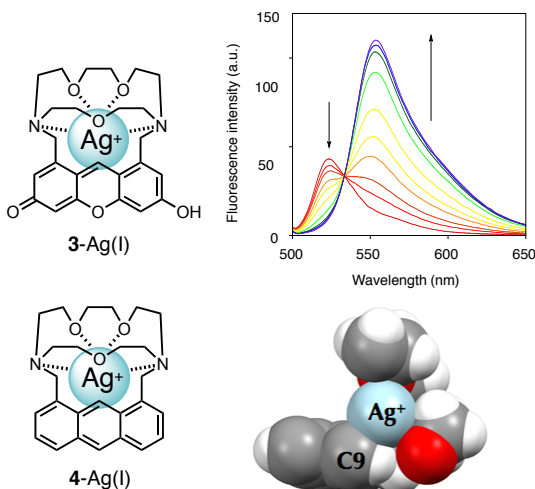
(1) 硫化水素の蛍光レシオイメージングへの応用

硫化水素は、生体内で血管拡張、炎症、記憶などの様々な機能に関わる重要なガス状の生理活性物質である。我々は、カドミウム錯体 **1-Cd(II)** が硫化水素(H₂S)を蛍光レシオ変化でセンシングできることを新たに見出した。この蛍光レシオ変化は、H₂S との相互作用により、**1-Cd(II)** からカドミウムイオンが脱離するため AM コンタクトが解消されることにより生じる。まず、**1-Cd(II)** は細胞外から添加し硫化水素に応答し、蛍光イメージングできることを見出した。さらに、蛍光プローブの機能を改良し、新たにピロニン型の蛍光プローブ **2-Cd(II)** を新たに開発した。**2-Cd(II)** は、**1-Cd(II)** で問題となった高濃度のグルタチオン存在下での蛍光消光を起こさないことから細胞内でも高い感度を維持した。この特性を利用して、細胞内の酵素により産生される内在性の硫化水素のレシオ検出が可能となった (下図 0 min から 10 min の蛍光レシオ変化)。



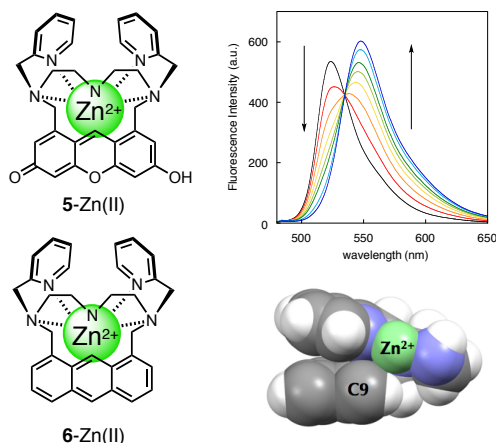
(2) 銀イオン選択的な蛍光プローブの開発

Type II の環状リガンドを持つ蛍光プローブをデザインし機能を評価したところ、15員環のアザクラウンエーテルを持つリガンド **3** が銀イオン選択的に蛍光応答し、大きな長波長変化 ($\Delta F = 34\text{nm}$) を生じることを見出した。アントラセン型の銀イオン錯体 **4-Ag(I)** の X 線結晶解析を行ったところ、銀イオンが蛍光団 9 位の炭素原子と 2.46 オングストロームの非常に近い位置に近接して接触し、AM コンタクトが生じていることが分かった。また、リガンド **3** の極めて高い銀イオン選択性は、蛍光団との二点架橋によりアザクラウンの環状構造が剛直となり、銀イオンのみに適したポア構造を持つためであることが推測された。



(3) 亜鉛錯体を AM コンタクトセンシングできる蛍光プローブの開発

これまでに我々が開発した Type I および Type II の蛍光プローブは、イオン半径の比較的大きな金属イオンに対しては AM コンタクトに基づく蛍光波長変化を示すものの、周期表 3d ブロックにあるイオン半径が比較的小さな亜鉛などの金属イオンに対しては蛍光応答しない。そこで我々は、新たに Type III の蛍光プローブのデザインを試みた。半環状型の配位部位をもつリガンド **5** をデザインしたところ、亜鉛イオンをはじめとして銅イオンやコバルトイオンなど様々な 3d ブロックの金属イオンとの結合により 20 nm におよぶ大きな長波長蛍光シフトを生じることを新たに見出した。アントラセン型の亜鉛錯体 **6-Zn(II)** の X 線結晶解析を行ったところ、亜鉛イオンが蛍光団 9 位の炭素原子と 2.96 オングストロームの非常に近い位置に近接して接触し、AM コンタクトが生じていることが分かった。この成果は、AM コンタクト機構がサイズの大きな金属イオンのみでなく、多くの金属で起こる広い一般性を示す成果であると考えている。研究期間終了後は、継続して **5-Zn(II)** を用いた細胞内亜鉛イオンの蛍光イメージングについての検討を行う予定である。



(4) その他

上記の成果以外に Type IV のプローブについて検討を行った。様々な蛍光分子を合成し、金属イオンに対する応答について検討を行った。いくつかの化合物において、金属イオンの配位に伴う AM コンタクトに特徴的な蛍光ならびに吸収の長波長シフトの現象を確認したが、現在までに、明確な AM コンタクトの証拠を得るには、至っていない。また、本研究を進める過程で興味あるいくつかの蛍光センシング現象を新たも見出し、これらの発見が生理活性物質を検出できる他の蛍光プローブの開発に結びついた。例えば、ヒスタミンによる蛍光プローブからのコバルトイオンの脱離に伴う蛍光回復現象を利用して、細胞外に放出されるヒスタミンのリアルタイムの可視化できる蛍光プローブや、過酸化水素によるキサンテンからキサントンへの蛍光色素変換現象を利用したマイトファジーの検出できる蛍光プローブの開発に成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

① I. Takashima, M. Kinoshita, R. Kawagoe, S. Nakagawa, M. Sugimoto, I. Hamachi, A. Ojida*, Design of Ratiometric Fluorescent Probes Based on Arene-Metal-Ion Interactions and Their Application to CdII and Hydrogen Sulfide Imaging in Living Cells, *Chemistry-an European Journal*, 20, 2184-2192 (2014). DOI: 10.1002/chem.201304181

② I. Takashima, A. Kanegae, M. Sugimoto, A. Ojida*, Aza-Crown-Ether-Appended Xanthene: Selective Ratiometric Fluorescent Probe for Silver(I) Ion Based on Arene-Metal Ion Interaction, *Inorg. Chem.*, 53, 7080-7082 (2014). DOI: dx.doi.org/10.1021/ic500980j

③ R. Kawagoe, I. Takashima, K. Usui, A. Kanegae, Y. Ozawa, A. Ojida*, Rational Design of a Ratiometric Fluorescent Probe Based on Arene-Metal-Ion Contact for Endogenous

Hydrogen Sulfide Detection in Living Cells,
ChemBioChem 16, 1608-1615 (2015).
DOI: 10.1002/cbic.201500249

④ I. Takashima, R. Kawagoe, I. Hamachi, A. Ojida*, Development of an AND Logic-Gate-Type Fluorescent Probe for Ratiometric Imaging of Autolysosome in Cell Autophagy, *Chem. Eur. J.* 21, 2038-2044 (2015).
DOI: 10.1002/chem.201405686

⑤ Y. Oshikawa, K. Furuta, S. Tanaka, A. Ojida*, Cell Surface-Anchored Fluorescent Probe Capable of Real-Time Imaging of Single Mast Cell Degranulation Based on Histamine-Induced Coordination Displacement, *Analytical Chemistry*, 88, 1526-1529 (2016).
DOI: 10.1021/acs.analchem.5b04758

⑥ 王子田 彰夫、高嶋 一平、新しい蛍光センシング機構開発に基づいた細胞機能解析、*薬学雑誌*, 136, 3-7 (2016).
DOI: 10.1248/yakushi.15-00225-1

[学会発表] (計 31 件、招待講演のみを下記に記載)

① Akio Ojida, Bioanalytical application of the metal ion-containing fluorescent probes, NNBS2013, 2013 年 9 月 20 日～21 日、九州大学

② Akio Ojida, Bioanalytical application of the metal ion-containing fluorescent probes, 錯体化学会第 63 回討論会, 2013 年 11 月 2 日～4 日、琉球大学

③ Akio Ojida, Development of the metal ion-containing fluorescent probes, 7th ISMM2013, 2013 年 11 月 7 日～9 日、九州工業大学

④ Akio Ojida, Development of Dual Emission Fluorescent Probes Based on Arene-Metal Ion Contact and Their Application to Cell bioimaging, 2014. 11. 30 ~ 2014. 12. 5, 7th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference, Gold coast. Australia

⑤ Akio Ojida, Development of Dual Emission Fluorescent Probes Based on Arene-Metal Ion Contact and Their Application to Cell bioimaging, 3rd Asian Chemical Biology Conference, 2014. 12. 15 ~ 2014. 12. 17. National University of Singapore, Singapore

⑥ 王子田 彰夫、新しいセンシングメカニズムに基づいた蛍光プローブの開発～キサンテン 9 位が関与する 3 つの研究ストーリー、同仁化学研究所講演会、2014 年 9 月 17 日、同仁化学研究所 (熊本)

⑦ Akio Ojida, Bioanalytical Application of Metal-Ion Containing Fluorescent Probes, 3rd ISPC2015, 2015. 12. 14. ~ 2015. 12. 15. Hawaii, USA

⑧ Akio Ojida, Bioanalytical Application of Metal-Ion Containing Fluorescent Probes, Pacificchem2015, 2015. 12. 15. ~ 2015. 12. 20. Hawaii, USA

⑨ 王子田 彰夫、新しいセンシング機構を利用した蛍光プローブ分子の開発、第 37 回 光医学・光生物学会、2015 年 7 月 18 日、宮崎

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://bunseki.phar.kyushu-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

王子田 彰夫 (OJIDA Akio)

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号 : 10343328