

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：34533

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860032

研究課題名(和文) 非可逆反応を利用した高感度かつ高選択的なカドミウムイオン蛍光プローブの開発

研究課題名(英文) Development of an irreversible fluorescent probe for highly sensitive and selective detection of cadmium ions

研究代表者

塚本 効司 (Tsukamoto, Koji)

兵庫医療大学・薬学部・助教

研究者番号：00454794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：有害な重金属イオンのひとつであるカドミウムイオンを簡便かつ高感度に検出可能な蛍光プローブを開発することとし、非可逆反応を利用したカドミウムイオンプローブの基本骨格を確立した。また、配位化学に基づいた実用的なカドミウムイオン蛍光プローブを開発することに成功し、カドミウムイオンを高感度かつ高選択的に検出できることを明らかにした。さらに、そのプローブを生細胞中におけるカドミウムイオンイメージングに適用できることを示した。

研究成果の概要(英文)：To develop a fluorescent probe for simple and sensitive detection of cadmium, recognized as a highly toxic heavy metal, we have constructed a basic structure of an irreversible fluorescent probe for cadmium ions. Moreover, we have developed a practical fluorescent probe for cadmium ions based on coordination chemistry, and demonstrated that it allows highly sensitive and selective detection of cadmium ions. It has also been shown that the probe is applicable to cadmium ion imaging in living cells.

研究分野：分析化学

キーワード：カドミウムイオン 蛍光プローブ

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 生体内におけるカドミウムイオンの可視化計測 (イメージング) の必要性

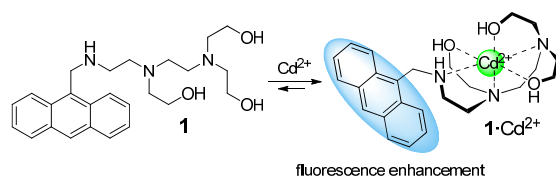
カドミウムは生体中のさまざまな器官や組織に障害を与えるほか、カドミウムの長期暴露は肺や前立腺、膵臓、腎臓においてガンを誘発することが示唆されている。しかしながら、その詳細なメカニズムは未だにわかっていない。それを解明するために、生体内に入り込んだカドミウムが「いつ、どこで、どれくらい」存在するかを可視化計測 (イメージング) する新たな手法が強く求められている。

その手法のひとつとして、蛍光プローブを用いた蛍光イメージング法がある。蛍光プローブとは、検出したい分子やイオンと反応して蛍光シグナルを発生する機能的な蛍光色素である。細胞内や生体内に投与することにより、観測対象を蛍光シグナルとして検出し可視化することが出来る。

カドミウムイオン ( $\text{Cd}^{2+}$ ) を可視化する蛍光プローブはこれまでにいくつか開発されているものの、その数は少なく、しかもそのほとんどにイオン選択性や感度が十分でない、水に溶けにくい等の問題がある。特に  $\text{Cd}^{2+}$  と  $\text{Zn}^{2+}$  の物理的および化学的性質が似ているためそれらを区別することが難しく、このことが  $\text{Cd}^{2+}$  プローブ開発の大きな障害となっている。研究代表者はこのような問題を解決し、 $\text{Cd}^{2+}$  イメージングに資する高性能な新規  $\text{Cd}^{2+}$  蛍光プローブの開発を進めてきた。

### (2) 研究開始当初までの研究の経緯

研究代表者は、 $\text{Zn}^{2+}$  にはほとんど応答せず、 $\text{Cd}^{2+}$  に特異的に応答し蛍光シグナルを発生する蛍光プローブ **1** を開発した (Scheme)<sup>1)</sup>。pH 7.2 の水溶液中における **1** の  $\text{Cd}^{2+}$  に対する解離定数は  $K_d = 1.0 \times 10^{-7}$  M と見積もられ、高感度に  $\text{Cd}^{2+}$  を検出できることが分かった。



Scheme

しかしながら、プローブ **1** には、蛍光増大率が約 2 倍と低い、 $\text{Cu}^{2+}$  により妨害を受ける、といった問題点が存在する。特に、 $\text{Cu}^{2+}$  は生体内に普遍的に存在するため、それによる妨害は必ず解決しなければならない。一方で、**1** の  $\text{Cu}^{2+}$  に対する親和性を低下させるように分子改良を行うと、 $\text{Cd}^{2+}$  に対する親和性

まで低下し、感度の低下を招くものと考えられた。

そこで、研究代表者は  $\text{Cd}^{2+}$  による非可逆反応を利用することも視野に入れ、感度と選択性が共に高い、新たな  $\text{Cd}^{2+}$  蛍光プローブを開発することにした。

## 2. 研究の目的

生体内  $\text{Cd}^{2+}$  イメージングに資する、高感度かつ高選択的な新規  $\text{Cd}^{2+}$  蛍光プローブの開発を目的とする。

## 3. 研究の方法

$\text{Cd}^{2+}$  が硫黄原子と結合しやすいことを利用し、化合物 **2** を新たな  $\text{Cd}^{2+}$  プローブとして設計した (Figure 1)。

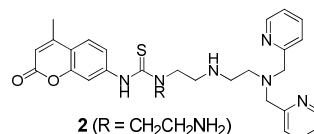


Figure 1 化合物 **2** の構造

蛍光色素である 7-アミノクマリンは、近傍に硫黄原子が存在すると、自身の蛍光が消光するという性質を有している。**2** に対して  $\text{Cd}^{2+}$  が作用すると、 $\text{Cd}^{2+}$  の包接と共にチオウレイド基が活性化され、分子内求核攻撃が進行しやすくなると考えられる。その結果、脱硫が起これ、硫黄原子によって消光されていたクマリンが蛍光を発するようになると考えた。

この設計に基づき、**2** およびその誘導体を種々合成し、 $\text{Cd}^{2+}$  蛍光プローブとして高性能な化合物を見つけ出すことにした。

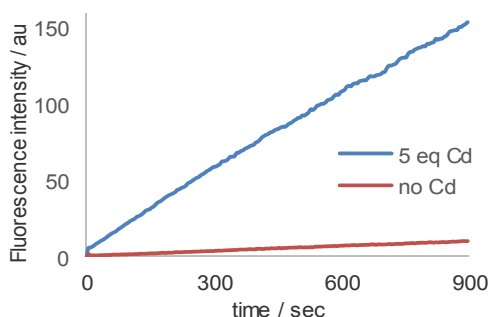
また、 $\text{Cd}^{2+}$  に対する選択性を向上させるため、 $\text{Cd}^{2+}$  の配位子として適している構造を同時に探索することとし、さまざまな配位子を有する  $\text{Cd}^{2+}$  蛍光プローブを設計し、合成することにした。

## 4. 研究成果

### (1) 非可逆反応を利用した $\text{Cd}^{2+}$ 蛍光プローブの開発

まずは、設計した化合物 **2** の合成を行い、その合成法を確立した。また、その合成法を用いて、**2** の構造を一部変化させた化合物を種々合成した。

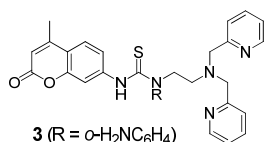
それらの化合物に対し、水中で  $\text{Cd}^{2+}$  を作用させたところ、望み通り化合物 **2** において蛍光シグナルが得られた (Figure 2)。研究代表者の知る限り、非可逆反応を利用した  $\text{Cd}^{2+}$  蛍光プローブの最初の例であり、プローブの基本構造として興味深い。



**Figure 2** Cd<sup>2+</sup>添加時 (5 eq) および非添加時における化合物 **2** (5 μM) の蛍光強度の経時変化 (pH 6.0 phosphate buffer (50 mM), λ<sub>ex</sub> = 325 nm, λ<sub>em</sub> = 470 nm)

一方で、化合物 **2** はやや不安定で、水中において徐々に分解することも明らかになった。この不安定性は、構造中に存在する第一級アミノ基の高い求核性に由来するものと考えられたため、安定性の向上を目的として、その第一級アミンより求核性の低い芳香族アミノ基に変換した化合物を設計し、合成することにした。

化合物 **2** において、Cd<sup>2+</sup> の配位子部位となるアミン鎖を短縮しても Cd<sup>2+</sup> に対する応答性は維持されることが分かったため、**2** のアミン鎖を短縮し、求核体を芳香族アミノ基に変換した **3** を設計した (Figure 3)。



**Figure 3** 化合物 **3** の構造

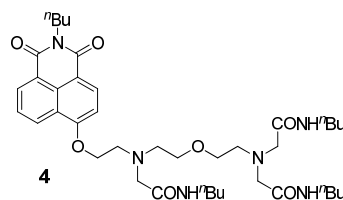
化合物 **3** を合成し、水中における安定性を調べたところ、**2** に見られたような分解反応が全く見られず、安定性が非常に向上した。しかしながら、Cd<sup>2+</sup> を作用させたところ、わずかな蛍光シグナルの増大がみられたものの、望みの非可逆反応はほとんど進行しないことが明らかになった。これは、芳香族アミノ基の求核性が低すぎるためと考えられ、求核体として芳香族アミノ基は適さないと考えられる。

プローブを実用化につなげるためには、化合物 **2** において反応性を維持しつつ安定性が向上するような構造変換を今後も継続して検討していく必要がある。

## (2) 配位化学に基づいた高性能な Cd<sup>2+</sup> 蛍光プローブの開発

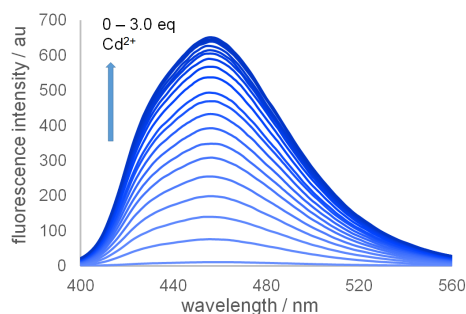
Cd<sup>2+</sup> に対して選択的かつ高い親和性を有する配位子構造を見出す目的で、以前開発した Cd<sup>2+</sup> プローブ **1** を基に種々の誘導体を合成

し、その物理的および化学的特性を調べた。その結果、実用的な Cd<sup>2+</sup> 蛍光プローブ **4** を開発することに成功した (Figure 4)。



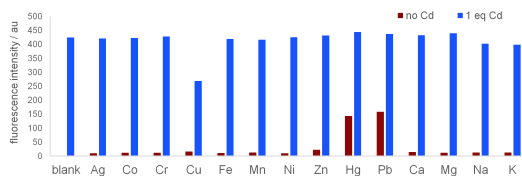
**Figure 4** プローブ **4** の構造

pH 7.2 の緩衝液中において、**4** の蛍光は高度に消光されており、Cd<sup>2+</sup> を作用させると瞬時に蛍光が増大した (Figure 5)。その蛍光増大率は最大約 40 倍であり、**4** の Cd<sup>2+</sup> に対する結合定数は  $K = 1.2 \times 10^6$  と高い値を示したことから、**4** は非常に高感度な Cd<sup>2+</sup> プローブであると言える。



**Figure 5** プローブ **4** (5 μM) の溶液に Cd<sup>2+</sup> を添加したときの蛍光スペクトル変化 (pH 7.2 HEPES buffer (50 mM), λ<sub>ex</sub> = 375 nm)

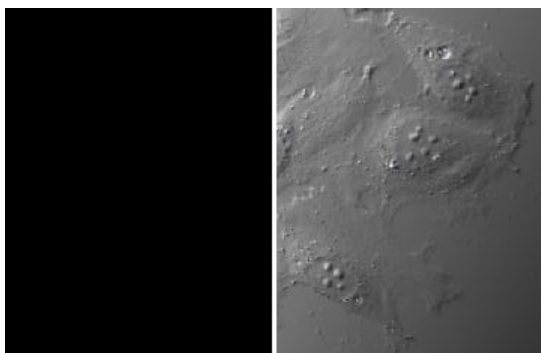
また、**4** に対してさまざまな金属イオンを作用させたところ、Hg<sup>2+</sup> および Pb<sup>2+</sup> について中程度の蛍光シグナルの増大が見られたものの、その他の金属イオンにはほとんど蛍光応答を示さず、Cd<sup>2+</sup> に対して高い選択性を示すことが明らかになった (Figure 6)。



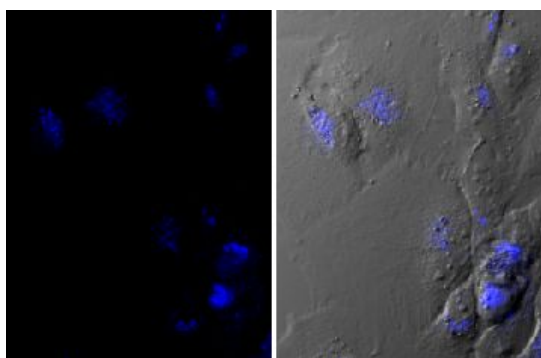
**Figure 6** さまざまな金属イオンに対するプローブ **4** の蛍光応答性 (probe **4** (5 μM) in pH 7.2 HEPES buffer (50 mM), λ<sub>ex</sub> = 375 nm, λ<sub>em</sub> = 456 nm)

さらに、**4** を用いて HeLa 細胞中の Cd<sup>2+</sup> イメージングを試みた (Figure 7)。

a) Probe 4 (10  $\mu$ M), 30 min



b) Probe 4 (10  $\mu$ M), 30 min; Cd<sup>2+</sup> (5  $\mu$ M), 3 h



蛍光像

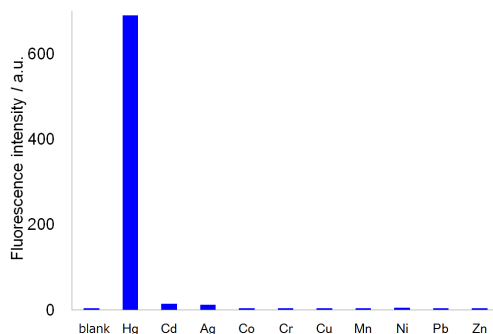
蛍光像と透過光像との重ね合わせ

**Figure 7** 共焦点蛍光顕微鏡を用いた HeLa 細胞中の Cd<sup>2+</sup> 蛍光イメージング

プローブ 4 を加えた培地で HeLa 細胞を 30 分間インキュベートした後、一方は Cd<sup>2+</sup> を加えず、もう一方は Cd<sup>2+</sup> を添加してさらに 3 時間インキュベートし、それぞれを蛍光顕微鏡で観察した。その結果、Cd<sup>2+</sup> を添加した細胞のみに強い蛍光が観測され、プローブ 4 は細胞内 Cd<sup>2+</sup> イメージングに有用であることが示された。

(3) ナフタルイミド誘導体の蛍光 off-on メカニズムを利用した蛍光プローブの開発

前述の通り、プローブ 4 は優れた蛍光 off-on メカニズムを有しており、Cd<sup>2+</sup> 以外の観測対象にも応用できる可能性があると考えられた。そこで、観測対象を Cd<sup>2+</sup> に絞らず、さまざまな可能性を考慮し、各種誘導体を合成した。その結果、プローブ 4 の末端アミド基をスルフィドに置換した化合物 5 が、Hg<sup>2+</sup> に対する高感度かつ高選択的な蛍光プローブになることが明らかになった (Figure 8)。このことは、5 が非常に有用な Hg<sup>2+</sup> プローブであることを示すと共に、今回見出したプローブ 4 の蛍光特性が、今後さまざまなプローブの開発に応用できる可能性を示唆しており、Cd<sup>2+</sup> プローブの開発に留まらず広く有益であると考えられる。



**Figure 8** さまざまな金属イオンに対するプローブ 5 の蛍光応答性 (probe 5 (8.3  $\mu$ M) in pH 7.2 HEPES buffer / DMSO (1:1),  $\lambda_{ex}$  = 369 nm,  $\lambda_{em}$  = 450 nm)

< 引用文献 >

1) Koji Tsukamoto, Shogo Iwasaki, Mari Isaji, Hatsuo Maeda, *Tetrahedron Lett.* **2013**, 54, 5971–5973.

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 0 件)

[学会発表](計 3 件)

塚本効司、島袋翔多、前田初男、ナフタルイミドを利用したカドミウムイオン蛍光プローブの開発とその蛍光応答メカニズムの解明、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 27 日、神戸サンボーホール(神戸市)

篠原悠夏、塚本効司、前田初男、高選択的水銀イオンプローブの開発、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 27 日、神戸サンボーホール(神戸市)

島袋翔多、塚本効司、前田初男、カドミウムイオンを高感度かつ高選択的に検出可能な蛍光プローブの開発、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 28 日、熊本市総合体育館(熊本市)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

塚本 効司 (TSUKAMOTO, Koji)

兵庫医療大学・薬学部・助教

研究者番号：00454794