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

王子田彰夫,* 高嶋 一 平

Development of Fluorescence Sensing Mechanism for Cell Functional Analysis

Akio Ojida* and Ippei Takashima

*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University;
3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan.*

(Received August 4, 2015)

Fluorescence probes are now widely used as indispensable tools in many cell functional analyses. At present, the design of fluorescent probes largely depends on the limited numbers of established sensing mechanisms such as photo-induced electron transfer (PET), photo-induced charge transfer (PCT), and fluorescence resonance energy transfer (FRET). Although these mechanisms are versatile in metal ion sensing, introduction of a new sensing mechanism is highly desirable not only to design a more sophisticated probe with high selectivity and sensitivity but also to expand the diversity of the sensing targets to unveil biological phenomena. In this article, we report the design of dual emission fluorescent probes for metal ions based on a unique fluorescence-sensing mechanism. The fluorescent probes incorporating this sensing mechanism displayed a large emission red-shift on complexation with metal ions such as Cd^{II} and Ag^{I} . X-ray crystallography and theoretical computational calculations of the Cd^{II} and Ag^{I} complexes revealed that the emission shift was induced by non-coordination contact between the aromatic ring of fluorophore and the metal ion (arene-metal ion contact; AM-contact), which modulates the energy levels of molecular orbitals. The fluorescent probe was successfully applied to *in cell* ratiometric bioimaging of bioactive hydrogen sulfide (H_2S). These successful applications highlight the usefulness of this sensing mechanism in biological fluorescence analysis.

Key words—fluorescent probe; sensing mechanism; metal ion; hydrogen sulfide; ratio analysis

1. はじめに

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始めとする様々な *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。これらの解析技術を駆使して、未知の生命現象の解明を実現するためには、ハードとしての光学分析機器の発達とともに、ソフトとしての分子プローブ開発が不可欠である。例えば、カルシウムイオンや活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) などの生体分子種を検出可能な蛍光プローブ開発が、これまで精力的に行われ、細胞機構を解明する分子ツールとして既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、検出対象を捕捉 (あるいは反応する) た

めのバインディングモチーフと、捕捉のイベントを蛍光シグナルへと変換させ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、有機化学の発展により、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、あまりバラエティに富んでいるとは言い難く、例えば、photo-induced electron transfer (PET), intramolecular charge transfer (ICT), fluorescence resonance electron transfer (FRET) 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。特に、蛍光波長の変化を伴う二波長レシオセンシングの機構を小分子型の蛍光プローブに組み込むことは、なかなか難しい。FRET は、二波長レシオセンシングを可能とする代表的な機構であるが、原理的に 2 つの蛍光団が必要であるため蛍光プローブの分子サイズの増大や水溶性の低下が

九州大学大学院薬学研究院 (〒812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1)

*e-mail: ojida@phar.kyushu-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 135 年会シンポジウム S27 で発表した内容を中心に記述したものである。

Fig. 1. Fluorescence ($\lambda_{\text{ex}}=500$ nm) and Absorbance Spectral Changes of **1** upon the Addition of Cd^{II} (0–1.1 eq)
Measurement conditions: $[\mathbf{1}]=5\ \mu\text{M}$, 50 mM HEPES buffer (pH 7.4)-MeOH (1 : 1), 25°C.

問題となる。一方で、ICTは二波長レシオセンシングに使い勝手のよい蛍光センシング機構であるが、ICTが動作する蛍光団は限られているため、蛍光プローブのデザインには、おのずと限界がある。以上のことより、ICTやFRETとは異なる新しい蛍光波長変化のセンシング機構が開発できれば、新たな蛍光プローブデザインが可能となり、これまでよりもさらに高感度、高選択的な蛍光センシング、あるいは、検出の難しかった新たな生理活性分子種の蛍光センシングが達成できる可能性がある。本小論では、この考えに基づいてわれわれが進めてきた金属イオンの新しい蛍光センシング機構の開発と、その細胞イメージングへの応用について概説する。

2. AMコンタクトの開発とセンシング応用

これまでにわれわれは主に、亜鉛イオンを蛍光プローブに組み込んだ金属錯体型の蛍光プローブを用いて、生体内リン酸アニオン種をセンシングできる蛍光プローブの開発を進めてきた。^{1,2)} この研究の過程においてわれわれは、亜鉛イオンのかわりに同族のカドミウムイオンを蛍光プローブ**1**に配位させると、蛍光波長が大きくレッドシフト ($\Delta\lambda=29$ nm)する新たな現象を見出した (Fig. 1).^{3,4)} この金属イオン錯化によって起こる蛍光レッドシフト現象の一般性を確認するため、異なる構造のリガンド部位

や蛍光団を持つ蛍光プローブをデザインし、様々な金属イオン種との錯体形成に伴う蛍光波長変化についてスクリーニングを行ったところ、以下のようなことが明らかとなった。

- (1) 蛍光波長のレッドシフトは、2,2'-dipicolylamine (Dpa) 以外の iminodiacetic acid (Ida) などをリガンド部位として持つ蛍光プローブにおいても起こる。
- (2) 蛍光波長のレッドシフトは、フロレセイン型のキサンテン蛍光団以外のアントラセンやローダミン型のピロニンを蛍光団として持つ蛍光プローブにおいても起こる。
- (3) 蛍光波長のレッドシフトは、カドミウムイオン $\text{Cd}(\text{II})$ 以外の第四あるいは第五周期の金属イオンである $\text{Hg}(\text{II})$, $\text{Ag}(\text{I})$, $\text{Pb}(\text{II})$, $\text{Au}(\text{III})$ などでも同様に観察される。
- (4) 一方で、第三周期の金属イオンである $\text{Ni}(\text{II})$, $\text{Zn}(\text{II})$, $\text{Cu}(\text{II})$ などでは、蛍光波長のレッドシフトは起こらない。

以上の結果から、金属イオンの錯化によって引き起こされる蛍光波長のレッドシフトは、かなり高い一般性を持つ現象であることが推測された。

次に、この蛍光波長変化のメカニズムの解析を行った。Figure 1に示すように、蛍光プローブ**1**の

Fig. 2. X-ray Crystallographic Analysis of 2-Cd(II)

カドミウムイオン錯化による蛍光レッドシフトは、同時に吸収波長のレッドシフトを生じる。このことより、カドミウムイオンの錯化は、基底状態における **1** の電子状態を変化させていると予測できた。そこで、**1** の類似化合物であり、同様にカドミウムイオンとの錯化により蛍光及び吸収波長のレッドシフトを起こすアントラセン型プローブ **2** の Cd(II) 錯体について X 線結晶解析を行い、その錯体構造を調べた。その結果を Fig. 2 に示す。興味あることに、**2**-Cd(II) 錯体において、Cd(II) イオンとアントラセン環は非常に近接しており、最も近接しているアントラセン C9 位の炭素と Cd(II) の距離は 3.14 Å であった。この距離は、芳香族炭素 (1.77 Å) とカドミウムイオン (1.58 Å) のファンデルワールス半径の和である 3.35 Å よりも小さかった。すなわち **2**-Cd(II) 錯体において、C9 炭素と Cd(II) イオンは接触している状態にある。同様の金属イオンと蛍光団 C9 位との接触構造は、キサンテンプローブ **1** や **2** の Ag(I) 錯体においても観察された。一方で、蛍光波長のレッドシフトを示さない **2** の二核 Zn(II) 錯体では、C9 炭素と Zn(II) イオンの距離は 5 Å 以上であり、両者の接触は観察されなかった。以上の構造解析の結果から、様々な金属イオン錯体で観察された蛍光波長のレッドシフトは、蛍光団と金属イオンとの接触より誘起されると推測された。また、密度汎関数法 (DFT 法) を用いた理論計算を用いて、金属イオンとの接触により引き起こされる蛍光団の電子状態変化について考察を行ったところ、Cd(II) や Ag(I) と蛍光団との静電的な相互作用により、HOMO-LUMO 間のエネルギー準位差が小さくなることで蛍光のレッドシフトが引き起こされている結論を得た。以上のようにわれわれは、金属イ

オンと蛍光団がファンデルワールス距離以内で直接的に接触することで蛍光波長のレッドシフトを引き起こす新しい蛍光センシングメカニズムを明らかにした。このような金属イオンによる蛍光波長シフトの現象は、1990 年に Czarnik らによりカドミウム錯体の例が報告されているが、⁵⁾ 波長変化メカニズムについては十分な考察がなされず、その後は、ほとんど忘れ去られている状態にあった。われわれは、この現象をメカニズムレベルで検討を加え、さらに、その現象の一般性を明らかにしたことになる。われわれは、この金属イオンの接触による蛍光波長シフト現象を arene-metal ion contact (AM コンタクト) と名づけた。

AM コンタクトによる蛍光波長シフトの現象は、金属イオンのセンシングにのみでなく、金属イオンと相互作用する物質の検出へと応用できる。硫化水素 (H₂S) は、近年、NO や CO に続く第三の生理活性ガスとして注目を集めており、血管の拡張や記憶の増強など多彩な作用を示すことが明らかにされている。⁶⁾ われわれは、**1**-Cd(II) が H₂S と相互作用することで不溶性の CdS を形成し、リガンド **1** を放出、その結果 AM コンタクトが解消され、蛍光波長のブルーシフトで H₂S の検出が可能になることを見出した。³⁾ 実際に試験管内にて **1**-Cd(II) に Na₂S を加えると、蛍光波長のブルーシフトが比較的迅速に観察された (Fig. 3)。また、HeLa 細胞内に **1**-Cd(II) を導入後、細胞外から Na₂S を添加すると細胞内において蛍光のレシオ変化を観測することが可能であった。**1**-Cd(II) は、グルタチオンと C9 位で反応することで蛍光消光してしまう。そのため感度が悪く、酵素により産生される細胞内在性の H₂S を蛍光検出することは困難であった。一方で、

Fig. 3. Ratiometric Fluorescence Detection of H_2S Using **1-Cd(II)**

(left) Fluorescence emission change of **1-Cd(II)** ($10\ \mu\text{M}$) upon addition of Na_2S ($[\text{Na}_2\text{S}] = 0, 2.5, 5, 6.5, 7.5, 10, 15,$ and $20\ \mu\text{M}$) in $20\ \text{mM}$ HEPES ($\text{pH}\ 7.4$), $\lambda_{\text{ex}} = 500\ \text{nm}$, $5\ \text{mM}$ glutathione at 37°C . (right) Time trace of fluorescence intensity ratio R ($F_{527\text{nm}}/F_{557\text{nm}}$) upon addition of Na_2S ($30\ \mu\text{M}$) in the presence of glutathione ($5\ \text{mM}$).

Fig. 4. Ratiometric Fluorescence Detection of H_2S Using **3-Cd(II)**

(left) Plot of the ratio value ($R = F_{599\text{nm}}/F_{619\text{nm}}$) of **3-Cd(II)** ($10\ \mu\text{M}$) upon addition of Na_2S . Measurement conditions: $20\ \text{mM}$ HEPES, $\text{pH}\ 7.4$. (right) Ratiometric detection of endogenously produced H_2S in HUVEC cells. Comparison of the ratio value changes in HUVEC cells in the presence or absence of the additives: (1) none, (2) VEGF ($40\ \text{ng/mL}$), (3) PAG ($100\ \mu\text{M}$), (4) VEGF ($40\ \text{ng/mL}$) + PAG ($100\ \mu\text{M}$).

ピロニン型の蛍光プローブ **3**-Cd(II) はグルタチオンと反応しないため、より高感度での H₂S 検出が可能となる (Fig. 4).⁷⁾ **3**-Cd(II) を HUVEC 細胞に導入後に血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) で細胞を刺激すると細胞内レシオ値の大きな上昇が観察された。また、このレシオ値の上昇は、硫化水素産生酵素である cystathionine γ -lyase (CSE) の阻害剤であるプロパルギルグリシン (PAG) の添加により効果的に抑制された。以上のことから **3**-Cd(II) は、CSE により細胞内で産生された H₂S を蛍光レシオ検出できることが明らかとなった。

3. おわりに

以上のようにわれわれは、蛍光波長変化を生じる新たなセンシングメカニズムとして AM コンタクトの開発を進めてきた。AM コンタクトは、蛍光団との接触のし易さから、イオン半径の比較的大きな第四並びに第五周期の金属イオンによって引き起こされる一方で、イオン半径のより小さな第三周期の金属イオンで AM コンタクト現象を観察することは困難であった。しかし、金属イオンと蛍光団との接触を促す様々な錯体の分子デザインを検討することで、最近ようやく、亜鉛イオンを AM コンタクト現象により蛍光レッドシフトで検出できる蛍光プローブを開発することにも成功した (未発表データ)。これは、AM コンタクトの普遍性が新たに実証された結果と言える。一方、AM コンタクトをさらに応用することで、H₂S 以外の様々な生理活性分子種の蛍光レシオセンシングが可能になると期待できる。上記の H₂S センシングでは錯体からの金属イオン脱離を用いたが、構造的にフレキシブルな錯

体を設計することで AM コンタクトを制御し、可逆的な蛍光レシオセンシングを達成することも可能である。ここでも錯体をどのように分子デザインするかが最も重要な鍵となる。AM コンタクトによる蛍光センシングの根本は、サブオングストロームレベルでの緻密な金属錯体の分子デザインと構造制御にある。そこから広がる新しい蛍光センシングの新しい未知の世界を目指して、今後も研究を進めていきたい。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Kurishita Y., Kohira T., Ojida A., Hamachi H., *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 18779–18789 (2012).
- 2) Kurishita Y., Kohira T., Ojida A., Hamachi I., *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 13290–13299 (2010).
- 3) Takashima I., Kinoshita M., Kawagoe R., Nakagawa S., Sugimoto M., Hamachi I., Ojida A., *Chemistry Euro. J.*, **20**, 2184–2192 (2014).
- 4) Takashima I., Kanegae A., Sugimoto M., Ojida A., *Inorg. Chem.*, **53**, 7080–7082 (2014).
- 5) Huston M. E., Engleman C., Czarnik A. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 7054–7056 (1990).
- 6) Lin V. S., Chang C. J., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **16**, 595–601 (2012).
- 7) Kawagoe R., Takashima I., Usui K., Kanegae A., Ozawa Y., Ojida A., *ChemBioChem*, **16**, 1608–1615 (2015).