

ライブセルイメージングを可能とする

テーラーメイド型生体内分子センサーの開発

Development of tailor-made molecular sensors for live cell imaging

大阪公立大学大学院理学研究科化学専攻 講師 中山 淳

Graduate School of Science, Osaka Metropolitan University, **Atsushi Nakayama**

要旨

生体内分子の機能解明研究にとって、生きた細胞中で生体内イベントを可視化できるライブセルイメージング用蛍光プローブの開発は必須である。近年注目を浴びている生体内分子として、硫黄原子が直鎖状に連なった構造を有する『超硫黄分子』がある。生体内に存在する様々な超硫黄分子を検出できる蛍光プローブの開発は未だ発展途上であることから、超硫黄分子を含む硫黄含有生体内分子を検出できる生体内分子センサーの開発を検討した。蛍光クロモフォアとして多置換ベンゼン、イソクマリンを選択し、それを基盤とした蛍光プローブの合成を行った。ベンゼン環蛍光プローブでは **turn-on** 型プローブの合成に成功した。イソクマリン型蛍光プローブでは、3-アシルイソクマリンの一般的合成法を確立し、目的の性質を有するイソクマリン化合物への官能基変換を検討した。

1. はじめに

生体内イベントには様々な化合物がシグナル分子によって引き起こされている。そのため、特定の刺激を選択的に感知し、可視化できるケミカルツールの開発が進められている。刺激を惹起する生体内原子として、硫黄原子が挙げられる。硫黄原子は自然界に普遍的に存在する元素であり、生物の生命活動において重要な働きを持つ。例えば、生体内調節機構（解毒作用や、ジスルフィド結合形成によるタンパク質の高次元構造形成）は、硫黄原子が有するすぐれた酸化還元能によって制御されている。多くの研究蓄積から、長らく生体内調節にはシステインやグルタチオン、ジスルフィド結合、そしてガスメディエーターである硫化水素 (H_2S) が中心的なシグナル分子であると言われてきた。例えば、硫化水素は平滑筋の弛緩作用や神経保護作用、抗炎症効果など

様々な生物活性を示す重要なシグナル分子である。そのため、生体内イベントに大きく関与する硫化水素が細胞内のどの位置で生成、作用するかを時空間的に高感度で検出するためのツール開発も活発に行われている。その重要な検出ツールとして蛍光プローブを利用した蛍光イメージングの利用がある。蛍光イメージングは高感度であるため、生体内に微量に含まれるシグナル分子の挙動を追跡するのに有効である。これには、シグナル分子と蛍光プローブが選択的に反応した時のみ特定の蛍光が検出可能 (**turn-on**) となる“仕掛け”が必要である。例えば、Chang らは、蛍光分子内にアジド基を導入し、硫化水素の還元作用によって電子吸引性のアジドが電子供与基のアミノ基へと変換される事で消光から発光へ切り替わる蛍光プローブを開発した [1]。その他、硫化水素に対する検出試薬が多く開発される中

で、近年「硫黄原子が直鎖状に連なった構造を有する『超硫黄分子』が生体内では豊富に存在し、これらが生命機構に重要な役割を果たしている」ことが報告され [2]、その生体内での役割や発生源を特定するべく様々な研究が行われている。その一方で、硫黄原子は酸化還元を受けやすく、細胞外では容易に代謝や酸化還元を受けてしまうことから、超硫黄分子の実態解明のため新たなツール開発が求められている。すでに、サルフェン硫黄分子と反応して蛍光分子を放出する化学プローブは実用化されており、超硫黄分子研究に用いられている [3]。その一方で、求核力が非常に高い還元型超硫黄分子と選択的に反応し、かつ生きた細胞内での可視化（ライブセルイメージング）を可能とする蛍光プローブ分子は開発の余地が残されている。さらに、生体内で蛍光分子が滞留する事で新たに生じる超硫黄分子の働きが観察しにくくなることも精密な細胞内解析の障害となる。

本研究では、超硫黄分子の生体内での働きを可視化する新たな蛍光プローブ（センサー分子）の開発を目指し、研究を開始した。様々な超硫黄分子に対する反応性を調節可能であり、既存品とは異なる可視光領域の波長で励起可能な turn-on 型、そして細胞膜透過性と除去性を併せ持つ新規センサー分子開発が最終目標となる。

2. ベンゼン環蛍光プローブの開発研究

はじめに、超硫黄分子と反応する官能基をアジド基に設定した新規蛍光プローブの設計合成を行なった。我々は電子供与基と電子吸引基が適切に配置されたジヒドロイソクマリン型天然物が蛍光分子として機能するということを報告している（図 1a） [4]。このような蛍光クロモフォアをもつ蛍光分子は報告され

ているものの、turn-on 型蛍光プローブはこれまでにほとんど開発されていなかったことから、ベンゼン環を母骨格とする以下のようなプローブ分子を合成することとした（図 1b）。すなわち、ベンゼン環上のカルボニルに対して 2 位に電子供与基、5 位に電子吸引基として働くアジド基を配置した化合物 **1** を設計した。本化合物の 3 位には蛍光の長波長化を期待して臭素原子を導入することとした。5 位のアジド基が還元性を持つ硫黄求核剤と反応して電子供与性のアミノ基へと還元されることで蛍光が on となることを期待した。また、我々はこれまでにチオール選択的反応性を示す低分子標識蛍光試薬の開発にも成功しており、適切な立体障害を持たせることで硫黄求核剤との反応を制御できることを示している [5]。アジド基への求核攻撃は 4、6 位に置換基を導入することで制御することを計画した。そこでまず、合成容易な蛍光プローブを合成し、turn-

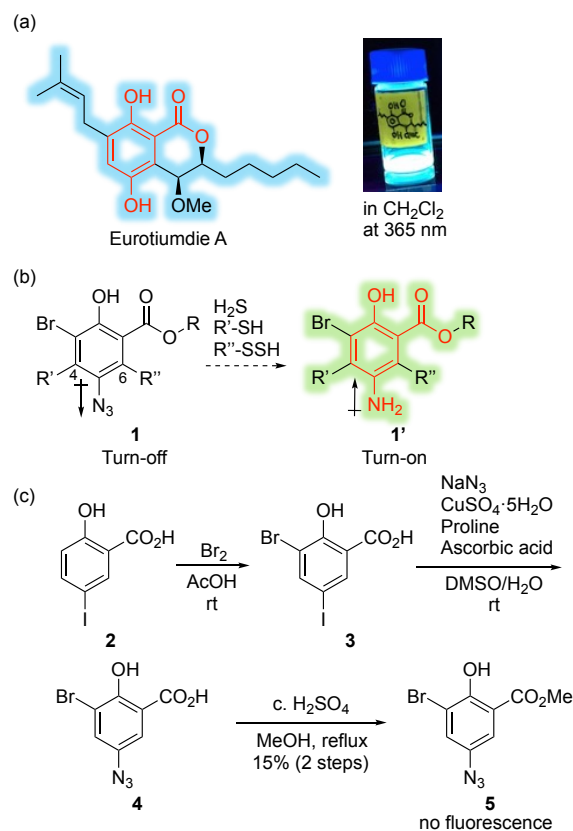


図1

on 型プローブとして機能するかを確認することとした。

実際の合成では、5-ヨード安息香酸 (**2**) に対して酢酸中、臭素を作用させることで 3 位に臭素を導入した化合物 **3** を得た (図 1c)。 **3** に対して、銅触媒、プロリン、アスコルビン酸存在下アジ化ナトリウムを作用させると **3** のヨウ素がアジド基に置換されたカルボン酸 **4** が得られた。 **4** を MeOH 中、硫酸を触媒量加えて加熱環流することでメチルエステル **5** を低収率ながら合成することに成功した。 **5** は有機溶媒中で 365 nm の紫外線照射下では無蛍光であった。初期検討として、硫化水素等化体である硫化ナトリウム (Na₂S) に対する **5** の反応性を評価した。 **5** を THF-水 (6:1) の混合溶媒に溶解させ、Na₂S を添加したところ、わずか 10 秒で反応は完結し、365 nm 照射下で強い蛍光を発することが分かった (図 2)。瞬時に反応が進行し蛍光が on となる性質は、生きた細胞中

の生体内イベントを観察するライブセルイメージングにとって有用であると考えられる。そこで、その他の硫黄含有化合物に対しても反応性があるかを確認することとした。50 μM のグルタチオン (GSH) と Na₂S をそれぞれリン酸バッファー (pH 6.0, 7.4, 8.0) 中で **5** と反応させたところ、どちらも同程度の速度で反応し、蛍光を発することがわかった。以上のように、硫黄求核剤によって turn-on する蛍光化合物を得ることができたものの、**5** の還元体 **6** の吸収波長は 350 nm 程度と短波長であり、誘導化による吸収の長波長シフトは困難が予想された。さらに、本化合物の 4、6 位への置換基導入は難しく、アジド基の求核剤に対する反応性を制御することは困難であった。また光安定性に乏しく、褪色が確認されたことから、ベンゼン環型蛍光分子を用いたライブセルイメージング用蛍光プローブの開発は保留することとした。

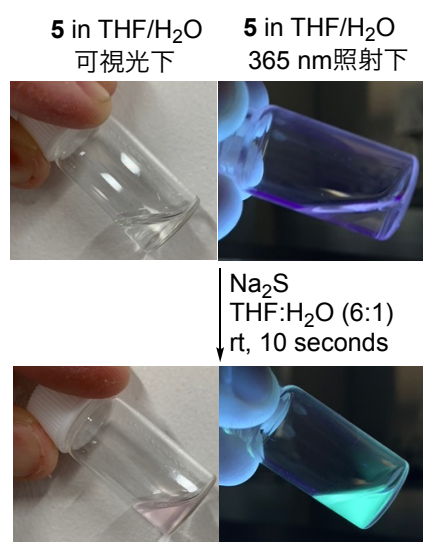
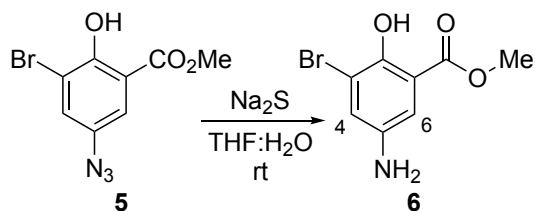


図2

3. イソクマリン型蛍光プローブ開発

ジヒドロイソクマリン型天然蛍光分子 [4] に関する蛍光構造活性相関を行う中で、3 位にアシル基を有し、8 位に電子供与基を有するイソクマリン含有化合物が比較的強い蛍光を示すことがわかった。またジヒドロイソクマリン型蛍光分子よりも光褪色性に優れる結果が示唆された。そこで、新たにイソクマリンを基盤とした蛍光プローブ合成に着手した。硫黄含有分子との反応残基としてはベンゼン環プローブでもアジド基は turn-on 型に有効であった。そこで、引き続きアジド基を反応基として用いることとした。超硫黄分子を含む硫黄求核剤への反応性はアジド基周辺の置換基の立体障害を調整することで制御することを計画した。課題の一つである吸収波長の長波長シフト化に関しては、イソクマリンの 3、4 位に

適切な官能基を導入することで実現可能と考えた。そこで、量子化学計算プログラムである

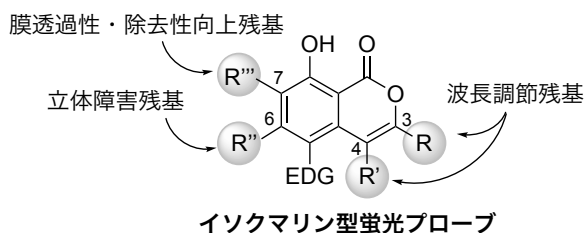


図3

Gaussian を用いて、様々なイソクマリン蛍光プローブ候補分子の吸収スペクトルならびに蛍光スペクトルを事前に計算したところ、共役系を伸長させることで吸収波長、蛍光波長の長波長シフトが期待できた。また、イソクマリン 7 位には細胞膜透過性や除去性に優れる残基 [6] を導入する。以上の考えを基に、イソクマリン型蛍光プローブを設計した (図 3)。

はじめに、適切な官能基を配置した 3-アシルイソクマリン誘導体を合成し、アシル部分を足がかりに 3 位部分に長波長シフトをアシストする残基を導入する計画である。

まず各種官能基を備えた 3-アシルイソクマリンの構築法に関して検討を行った。イソクマリン化合物の合成法は多くの報告例があるものの、3-アシルイソクマリンの構築法はこれまでに数例ほどしか報告がなかった。そこで、新たな簡便合成法を開発することから始めた。我々はジヒドロイソクマリン型天然物 eurotiumide 類の全合成において Pd 触媒を用いた CO 挿入反応 (フルオロカルボニル化) とラクトン化反応を組み合わせることで効率的にジヒドロイソクマリン骨格が構築できることを報告している [4]。本法を電子吸引基であるエステル、ベンジル位に脱離能の高い塩素原子を有する基質 **8** に適用すれば、フルオロカルボニル化/ラクトン化反応が進行したのちに、エステルの α 位からの脱プロトン化に続けて β 脱離、芳香化が進行して所望のイソクマリン **9**

が合成されると考えた (図 4a)。基質である β -クロロ- α -ヒドロキシエステル誘導体は、容易に入手、調製可能なブロモベンズアルデヒド誘導体から二工程の変換で合成することとした。もっとも単純な基質を例として合成経路を示す (図 4b)。2-ブロモベンズアルデヒド (**10**) に対してクロロギ酸エチルを用いた

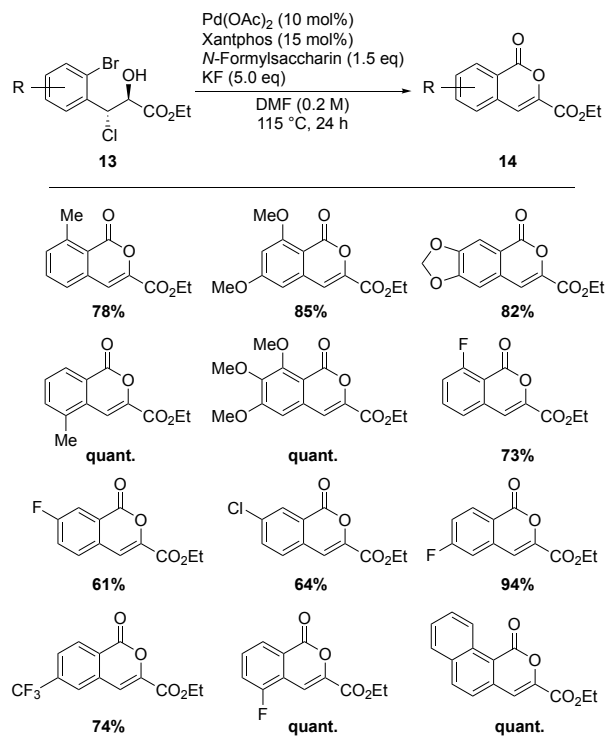
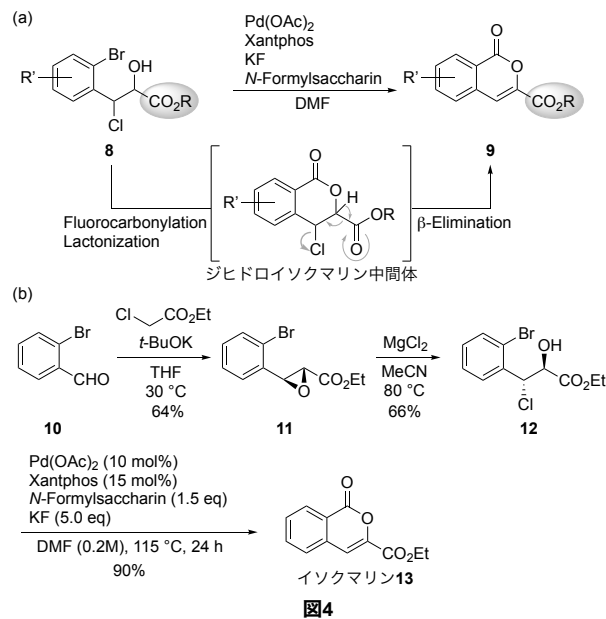
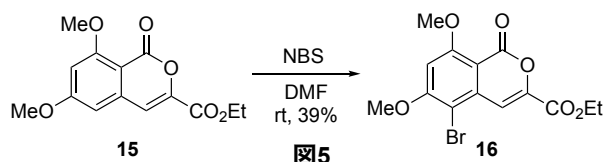


表1

Darzens 反応によりエポキシド **11** を合成した。これに対し、アセトニトリル中で塩化マグネシウムを作用させるとベンジル位選択的に塩素原子が導入されたβ-クロロ-α-ヒドロキシエステル誘導体 **12** を得た。これに対して Pd 触媒を用いた連続反応条件を適用したところ、反応は想定通り進行し、90%で目的の 3-アシルイソクマリン **13** の合成に成功した。

本反応条件を精査し、DMF (0.2 M) 中、Pd(OAc)₂ (10 mol%)、Xantphos (15 mol%)、N-formylsaccharin (1.5 当量)、フッ化カリウム (5.0 当量) と 115 °C で 24 時間反応させる条件を最適とした。続いて基質適用範囲の検討を行った。ベンゼン環上に電子供与基、電子吸引基、あるいは多環式基質を用いた場合も良好な収率で対応する 3-アシルイソクマリン **14** を得ることに成功した (表 1)。本反応はさまざまな置換様式を有する 3-アシルイソクマリンの一般的な合成として利用できると考えられ、本合成法を天然物合成にも応用している。また、8 位に電子供与基を有するイソクマリン誘導体は蛍光特性を示すことも確認した。

続いて、イソクマリン骨格の 5 位にアジド基を導入する足がかりとして、ハロゲン原子の導入を検討した (図 5)。種々検討の結果、3-アシルイソクマリン **15** に対して *N*-ブロモスクシンイミド (NBS) を作用させると、選択的に 5 位を臭素化できることを見出した。



現在は、臭素原子のアジド基への変換、イソクマリン 4 位への置換基導入の足がかりとなる 3-アシル-4-ヒドロキシイソクマリンの合成を検討している。

4. まとめ

本研究では、i) turn-on 型かつ ii) 蛍光波長を調節可能な iii) 細胞膜透過性・除去性に優れた生体内分子センサー開発を最終目標に、ベンゼン環型ならびにイソクマリン型蛍光プローブの合成検討を行った。その中で、3-アシルイソクマリンの一般的な合成法開発した。蛍光波長の調節や硫黄求核剤に対する反応性制御など、解決すべき課題は多いが、一つ一つ課題を乗り越えることで最終目標であるテーラード型センサー分子の開発を達成したい。

謝辞

本研究の実施に際して援助賜りました公益財団法人 京都技術科学センターに感謝申し上げます。

参考文献

- [1] A. R. Lippert, E. J. New, C. J. Chang. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 10078–10080 (2011).
- [2] T. Ida, T. Sawa, H. Ihara, T. Akaike. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 7606–7611 (2014).
- [3] K. Hanaoka et al. *Chem. Commun.* **53**, 1064–1067 (2017).
- [4] A. Nakayama et al. *Eur. J. Org. Chem.* 4013–4017 (2018).
- [5] A. Nakayama et al. *Commun. Chem.* **3**, No.6 (2020).
- [6] R. Kamada et al. *PLOS ONE* **11**, e0160625 (2016).

研究成果発表

- 1) A. Nakayama et al. “Concise Synthesis of Isocoumarin-3-carboxylic Acid Esters” *Chem. Lett.* **52**, 640–643 (2023).
- 2) A. Nakayama et al. “Total Synthesis of Bipenicilisorin and Assignment of the Absolute Configuration” *J. Nat. Prod.* **87**, 1394–1400 (2024).