

論文の内容の要旨

論文題目：光誘起電子移動を作働原理とする可視光励起光ラベル化剤群の開発

氏名：井上 大輝

■ 背景・目的

光ラベル化剤とは、暗所では安定であるが光照射を受けると活性種を産生し、タンパク質などの生体分子と反応して共有結合を形成する分子である。代表的な光ラベル化剤として、アジド、ジアジリン、ベンゾフェノンが挙げられ、薬剤と相互作用するタンパク質の同定法である photoaffinity labeling に利用されている。既存の光ラベル化剤は、いずれも活性種産生に紫外光を要するため、DNA 損傷^[1] や ROS 産生^[2] など細胞への障害が避けられない。可視光で機能する光ラベル化剤が開発されれば、より温和な条件での光ラベル化となるだけでなく、異なる波長の光によって複数の時刻、空間での光ラベル化も可能となり、生命科学研究に有用なケミカルツールになり得ると考え、本研究において可視光励起光ラベル化剤群の開発を目指した。

■ 分子設計：光誘起電子移動を駆使したカルベン産生

ジアゾ基は、紫外光により励起され活性種カルベンを産生することが知られている。修士課程では、ジアゾ基の共役系を coumarin に組み込んだ光ラベル化剤を設計、評価し、400 nm の光で機能することを示した。更なる長波長化を目指し、coumarin よりも長波長光を吸収する rhodamine や rhodol を母核としたが、それぞれ暗所で不安定であり、更なる長波長化は達成できなかった。そこで博士課程では、ジアゾ基が一電子還元によってカルベンを産生することに着目した^[3]。そのカルベン産生は“分子間の光誘起電子移動”による一電子還元によっても進行することが報告されている^[4] (Figure 1-a)。一方で、fluorescein や rhodamine に代表されるような xanthene 系色素は、可視光を吸収する xanthene 部位と、benzene 部位の共役系が独立している。そのため、色素によっては xanthene 部位の励起によって xanthene 部位から benzene 部位へ一電子移動する“分子内の光誘起電子移動”が起こることを当研究室で見出してきた^[5] (Figure 1-b)。これら 2 つの知見を受け、ジアゾ基からのカルベン産生は xanthene 系色素の“分子内の光誘起電子移動”による一電子還元によっても進行すると考え、可視光励起光ラベル化剤となることを期待した。

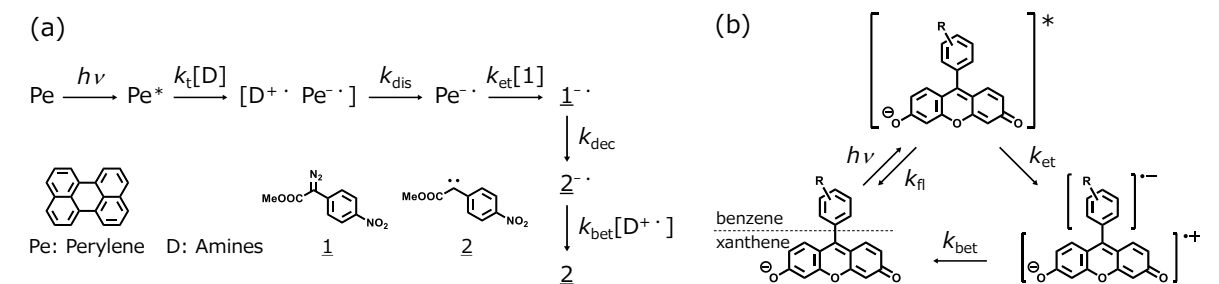


Figure 1 | (a) Carbene release via intermolecular photoinduced electron transfer. (b) Intramolecular photoinduced electron transfer in xanthene dyes.

■ 可視光励起光ラベル化剤群の開発

先述の分子設計に則り 5A2Me-Fluo および 5DA2Me-Fluo を設計, 合成した (Figure 2-a). 光学特性を取得したところ, 吸収スペクトルに変化は認められず (Figure 2-b), ジアゾ化により低蛍光性となることが分かった (Figure 2-c). 前述したように, fluorescein 誘導体の中には光誘起電子移動を消光原理とする弱蛍光性誘導体が存在し, その蛍光量子収率と benenze 部位の LUMO エネルギーとの間に相関があることが知られている^[5]. 実際, 5DA2Me の LUMO エネルギーは光誘起電子移動が起こる閾値を超えており, ジアゾ化による消光は光誘起電子移動に因ることが強く示唆された (Figure 2-d). 続いて, 493 nm の光照射によって光反応が進行するかを検証したところ, 光照射依存的に 5DA2Me-Fluo が消失し, ジアゾ基がヒドロキシ基となった光反応生成物が認められた (Figure 2-e). また, 各光照射時間ごとに蛍光スペクトルを取得したところ, 光照射時間依存的に蛍光強度が増大することが明らかとなった (Figure 2-f). これは低蛍光性の 5DA2Me-Fluo から, 強蛍光性の光反応生成物が生成したことに起因すると考えられる. 最後に, タンパク質を光ラベル化できるかを精製タンパク質 BSA を用いて検証した. 結果, 光照射を行った場合のみ BSA のバンドから蛍光が認められ, 5DA2Me-Fluo が光ラベル化剤として機能することが明らかとなった (Figure 2-g). また, 更なる長波長化を目指し, 色素母核を rhodamine または Si-fluorescein に変更したところ (Figure 2-h), それぞれ 550 nm, 600 nm の光依存的に BSA をラベル化し, 可視光励起光ラベル化剤群の開発に成功した.

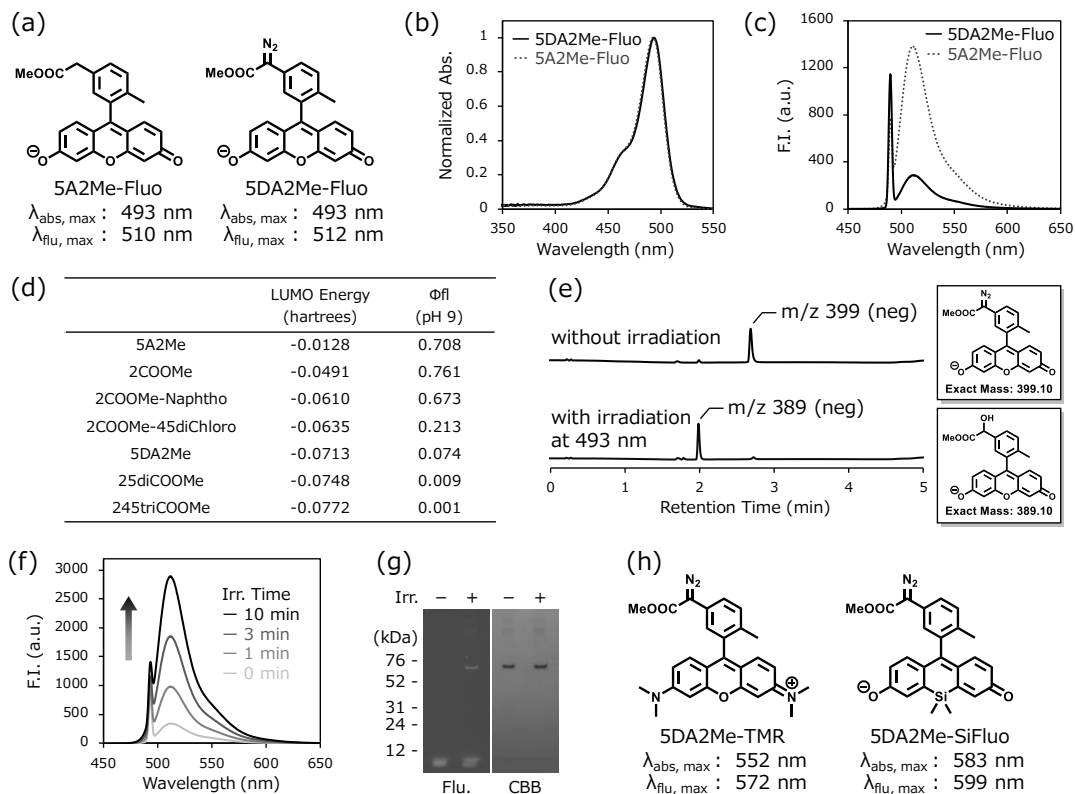


Figure 2 | (a) The structure and photophysical properties of 5A2Me-Fluo and 5DA2Me-Fluo. (b) Absorption and (c) fluorescence spectra in pH 9.0 0.1 M NaPi buffer. (d) Table of the relationship between LUMO energy and Φ_{fl} . (e) Analysis of 5DA2Me-Fluo aq. with or without 493 nm irradiation for 30 min. (f) Fluorescence spectra with 493 nm irradiation for 0-10 min. (g) Photolabeling of 1 mM purified BSA by 0.1 mM 5DA2Me-Fluo with 493 nm irradiation for 30 min. (h) The structure and photophysical properties of 5DA2Me-TMR and 5DA2Me-SiFluo.

■ Photoaffinity Labeling への応用

次に、開発した光反応反応性基が photoaffinity labeling に適用できるかを検証した。標的タンパク質は CA II (carbonic anhydrase II), リガンドは sulfonamide を採用し、リンカー長の異なるプローブを計 3 種類合成した (Figure 3-a). 精製 CA II に対して光ラベル化を行ったところ、リンカー長 $n=1$ のプローブで最も強い蛍光が認められた (Figure 3-b). 続いて、living RBCs (red blood cells) の内在性 CA II を選択的に光ラベル化できるかを検証した。結果、living RBCs の内在性 CA II を選択的に光ラベル化することができ、そのバンドは阻害剤 EZA (ethoxzolamide) の存在下で消失することを確認し、開発した光ラベル化剤が生細胞に適用できることを示した (Figure 3-c).

■ 一細胞蛍光標識への応用

これまでの検討より、5DA2Me-Fluo は光照射依存的に蛍光性を回復し (Figure 2-f), 同時にタンパク質をラベル化する特性を有することが分かっている (Figure 2-g). これを活かし、一細胞蛍光標識に応用できると考えた。Hela cells に 5DA2Me-Fluo を添加した後、一細胞だけに 488 nm 光照射を行うことで、一細胞を選択的に蛍光標識できることを示した (Figure 4-a). また、視野全体に光照射を行った後に MeOH 固定をしたところ、固定後も蛍光シグナルが認められ、細胞内のタンパク質を光ラベル化することで細胞内滞留性を獲得することが示唆された (Figure 4-b 上段).

■ 総括・展望

本研究において、光誘起電子移動を駆使することで 500~600 nm の光で機能する光ラベル化剤群の開発に成功した。さらに、生細胞中の内在性 CA II を選択的に光ラベル化できること、一細胞蛍光標識に応用できることを示した。今後は、異なる波長の光によって複数の時刻、空間での光ラベル化を行い、オミックス解析や細胞系譜解析などに応用していきたい。

参考文献 [1] *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **571**, 19 (2005). [2] *Photochemistry and Photobiology* **91**, 140 (2015). [3] *Acc. Chem. Res* **21**, 400 (1988). [4] *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 21274 (2002). [5] *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 14079 (2004).

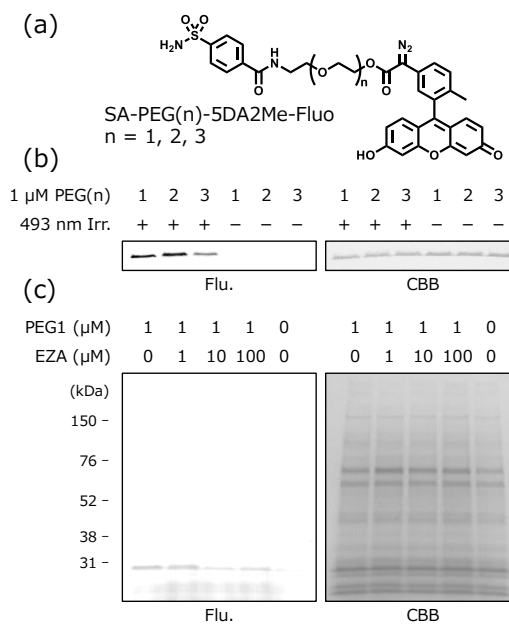


Figure 3 | (a) The structure of SA-PEG(n)-5DA2Me-Fluo. (b) Photolabeling of 1 μM purified CA II by 1 μM SA-PEG(n)-5DA2Me-Fluo with and without 493 nm irradiation for 30 min. (c) Photolabeling of endogenous CA II in living RBCs by 1 μM SA-PEG1-5DA2Me-Fluo with 493 nm irradiation for 30 min.

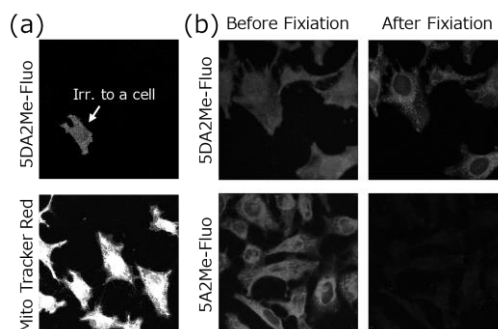


Figure 4 | Fluorescence images of Hela cells stained by 1 μM 5DA2Me-Fluo or 5A2Me-Fluo with 493 nm irradiation (a) to a single cell, and (b) to cells before and after MeOH fixation.