

論文の内容の要旨

論文題目 Hydroxymethyl rhodamine 類を用いた蛍光プローブの理論的設計法の開発

氏名 橋 椋

【背景】

Hydroxymethyl Rhodamine (HMR) 類は、蛍光性の open form とスピロ環化体である無蛍光性の closed form との平衡状態で存在し、二者の存在比が溶媒の pH に応じて可逆的に変化する性質を有する (Fig.1)。当研究室ではこれを利用して、化合物固有の値である pK_{cycl} (蛍光団由来の吸光度が最大値の半分となる pH) や τ (open form の寿命) を最適化することで、酵素活性検出や超解像イメージング等に应用可能な多様な蛍光プローブの開発に成功してきた。

本研究ではこの HMR 類の平衡反応を量子化学計算に基づいて精密に解析し、これまで誘導体合成と測定によるトライ & エラー方式で最適化を行うしかなかった pK_{cycl} および τ を構造のみから予測する方法を確立することで、効率的な蛍光プローブ開発を実現することを目的とした。

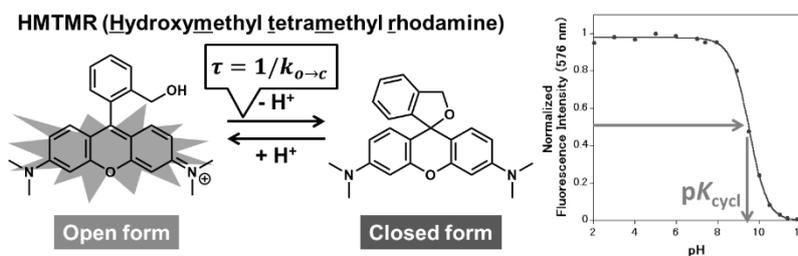


Figure 1 Intramolecular spirocyclization of HMR derivatives.

【結果】

1. 酸塩基平衡モデルの構築と pK_{cycl} の予測

まず、 pK_{cycl} の予測を試みた。HMR 類のアニリン性アミノ基・hydroxymethyl (HM) 基の酸塩基平衡を考慮した分子内平衡モデルを設定し pK_{cycl} の計算式を導いた (Fig.2)。式中の K_A を open/close 間の自由エネルギー差から求め、 pK_{cycl} を計算した。

正確な自由エネルギーを計算するため、色素分子だけでなくこれに水素結合する溶媒水分子を誘電体モデルとは別途計算に含め、実験値との比較が

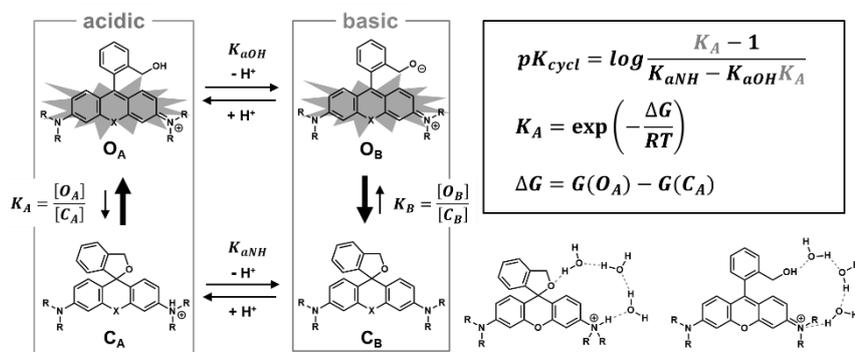


Figure 2 Calculation model for pK_{cycl} prediction.

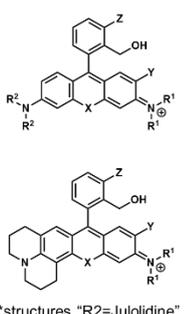
ら溶媒水分子によるプロトンの受け渡し・電荷の非局在化が自由エネルギーに与える影響を評価した。

結果、アニリン性アミノ基と HM 基を三分子の水分子によって架橋する構造が正確な自由エネルギー計算において重要であることが明らかになった。また R=H の rhodamine green (RG) 骨格においては、N-H 結合近辺に電荷の偏りを和らげる追加の水分子を配置することで、初めて正確な予測が可能となることも明らかとなった。

以上の水和構造を用いた計算によって、既存の HMR 類誘導体の pK_{cycl} 実測値を精度良く再現することに成功した

(Fig.3)。

本予測法は HMR 類の様々な部位への置換基の導入による pK_{cycl} の変化を再現可能な汎用性・普遍性の極めて高い方法であり、未知の HMR 誘導体の pK_{cycl} に対しても正確な予測が可能であることが期待された。



	X	Y	Z	R ¹	R ²	Measured pK_{cycl}	Calculated pK_{cycl}	Error
HMRG	O	H	H	H	H	8.1	7.9	0.2
HMTMR	O	H	H	Me	Me	9.5	9.5	0.0
HMRB	O	H	H	Et	Et	9.2	9.3	0.1
HMSiR	SiMe ₂	H	H	Me	Me	5.7	6.2	0.5
HMJR	O	H	H	H	Julolidine*	10.3	10.7	0.4
HMDiMeFR	O	F	H	H	Me	8.2	8.3	0.1
HMDiMeCR	O	Cl	H	H	Me	7.7	7.3	0.4
HMJFR	O	F	H	H	Julolidine*	9.8	9.8	0.0
HMJCR	O	Cl	H	H	Julolidine*	9.1	8.7	0.4
HMSiR620h	SiMe ₂	H	H	H	Me	5.0	4.8	0.2
HMSiR	SiMe ₂	H	H	H	Julolidine*	6.6	7.1	0.4
3MHMRG	O	H	Me	H	H	6.6	6.1	0.5
3CF3HMRG	O	H	CF ₃	H	H	5.3	5.3	0.0

Figure 3 Calculated and measured pK_{cycl} of HMR derivatives.

2. pK_{cycl} の予測に基づく新規蛍光プローブの開発

確立した pK_{cycl} 予測法を用いて、一部のがん細胞で高発現している γ -glutamyltransferase (GGT) 活性を検出可能なプローブの開発を試みた。HMR 類を用いた GGT プローブの設計は緑色蛍光を持つ RG 骨格

(HMRG) において既に報告がある¹が、本研究での予測手法を用いることで、パイロット化合物の合成・実測の試行錯誤を全く必要とせず、HMRG と同等の pK_{cycl} をもつ他の蛍光波長をもつプローブ群を開発できることが示された。実際開発した新規プローブ群の散布・投与により、マウスモデル

を用いた *in vivo* 迅速がんイメージングにも成功した(Fig.4)。

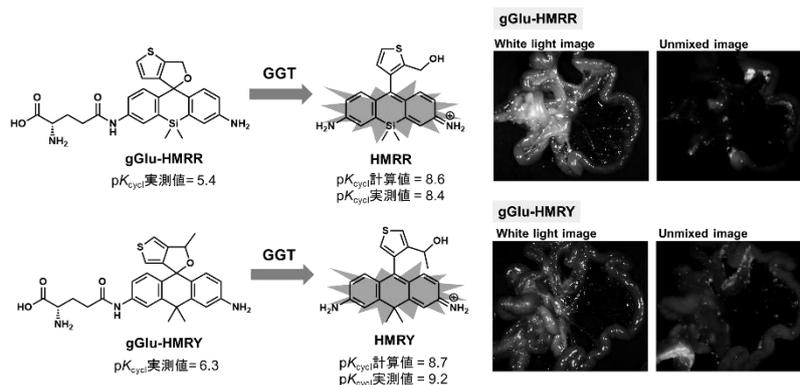


Figure 4 Design of GGT-activatable fluorescence probe based on pK_{cycl} prediction.

3. スピロ環閉環反応モデルの構築と τ の予測

次に τ の予測を試みた。スピロ環閉環反応のモデルとして2種の素反応 (A 反応・B 反応) の

pH に応じた重ね合わせを想定した。図の O_A 、 O_B を起点とする2つの反応が pH による両者の存在比の変化に対応して寄与率を変化させることで実質的な閉環速度を変動させていると考えた (Fig.5)。各反応の遷移状態と open form から活性化エネルギーを計算し、正確

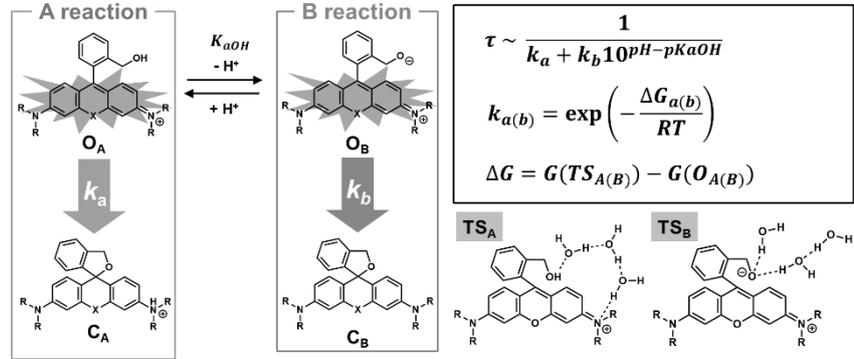


Figure 5 Calculation model for τ prediction.

な計算結果を与える溶媒水分子の効果や汎関数等の計算条件を実験値との比較から探索し、計算コストを抑えながら信頼性の高い結果を導く条件を複数見つけた。

τ の実測値は過渡吸収測定によって行った。具体的には closed form のスピロ環化合物に短波長レーザーパルス照射して一過的に open form を生じさせ、これが熱的に closed form へと戻る速度を吸光度の時間変化から評価した。測定を行った全ての誘導体において、計算値は実測値と pH 依存的な変化を含めて良く一致した (Fig.6)。

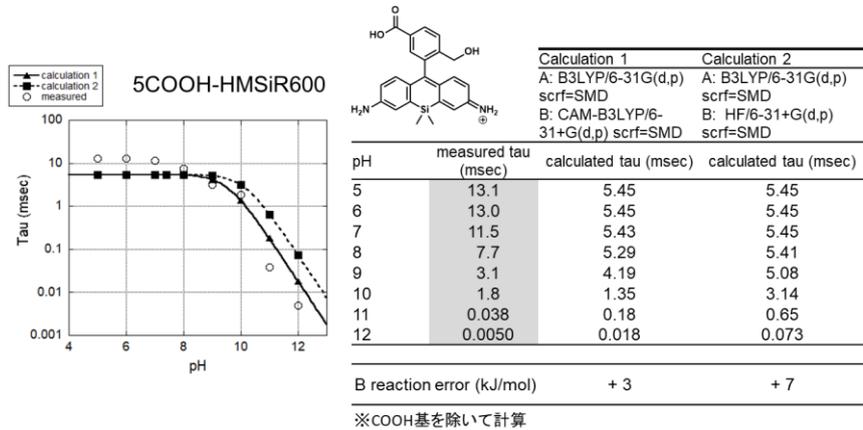


Figure 6 Calculated and measured τ of HMSiR600.

4. τ の予測に基づく新規超解像イメージングプローブの開発

光学顕微鏡の空間分解能の限界を突破する超解像イメージングの一つとして広く知られる single-molecule localization microscopy (SMLM) は、顕微鏡の視野内の色素を重ならないように順次光らせ、それぞれ輝点の位置を決定した後でそれらを一枚の画像に統合する方法であり、HMR 類の自発的明滅を用いて SMLM を行うことが可能であることが報告されている²(Fig.7)。本研究で開発した pK_{cycl} および τ の予測法に基づき、SMLM 技法に適した様々な蛍光色の自発的明滅プローブの構造を計算から予測し、実際に合成し機能評価を行うことで、488nm・561nm で励起可能な新規超解像プローブの設計に成功した。そのうち 561nm で励起可能な色素については実際に合成したプローブを用いて生細胞における微小管の超解像イメージングを達成した (Fig.8)。

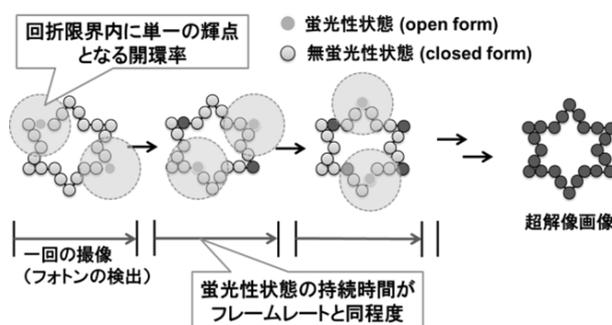


Figure 7 SMLM with HMR probes.

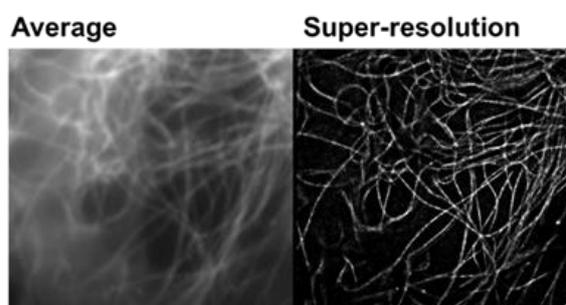


Figure 8 Super-resolution imaging by HMR probes designed based on pK_{cycl} and τ calculation.

【総括・展望】

本研究では量子化学計算によって HMR 類の分子内開環・閉環反応機構を解析し、理論的な物性の予測に基づく新規プローブ分子デザイン法を確立した。さらにこれを応用して、これまで設計の困難であった種々の蛍光プローブ開発にも成功した。精密な溶媒効果の評価を用いた本計算手法は実験のみによる検討からは困難であった分子設計を実現するだけでなく、HMR 類の開環・開環平衡にとどまらない様々な化学反応へ適用範囲を広げていくことも可能と考えられる。

1) Sakabe, M. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 409. 2) Uno, S. N. *et al.*, *Nature Chem.*, **2014**, *6*, 681.