

論文の内容の要旨

論文題目

N-Ph rhodamine 類の消光機構の解析と蛍光プローブ開発への応用

氏名 岩木 慎平

【序論】

Rhodamine とは、キサンテン環の 3,6 位に N 原子が結合した色素の総称である (Fig. 1)。Rhodamine 類は高い蛍光量子収率、強い光退色耐性とともに入溶性を併せ持つ蛍光色素であり、蛍光プローブの母核として汎用されてきた。一方、蛍光消光団である QSY 類に代表される rhodamine の N 原子に Ph 基が結合した誘導体 (これを *N*-Ph rhodamine 類とする) は、rhodamine と極めて類似した構造であるにも関わらず、無蛍光性であることが知られている (Fig. 1)。これまで *N*-Ph rhodamine 類は蛍光消光団としてのみ利用されてきたため、詳細な消光機構に関しては調べられてこなかった。しかし近年、*N*-Ph rhodamine 類を母核とした蛍光プローブ^{1,2)}の開発が報告されてきている。そこで本研究では、この *N*-Ph rhodamine 類の無蛍光性のメカニズムの解析を行い、得られた知見を基に論理的に *N*-Ph rhodamine を母核とした新たな蛍光プローブを開発することを目指した。

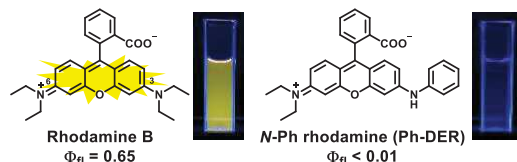


Figure 1. Chemical structures and fluorescence images of rhodamine B and *N*-Ph rhodamine.

【*N*-Ph rhodamine 類の消光機構の解析】

N-Ph rhodamine 類は、高粘性溶媒の glycerol 中にて蛍光性になることが知られている。³⁾ このことから励起状態での分子の立体配座の変化が蛍光消光において重要であると考えられた。そこで、時間依存密度汎関数法 (TD-DFT) により Fig. 1 に示した Ph-DER の励起状態での最安定構造を計算した。その結果、キサンテン環-N 原子間の結合が 90 度ねじれた構造が励起状態での最安定構造となり、その際に強い分子内電荷移動 (ICT) 状態を形成するという計算結果が得られた (Fig. 2a,b)。すなわち、 $S_1 \rightarrow S_0$ が CT 遷移になることで振動子強度が 0 となり、結果として無蛍光性になることが示唆された (Fig. 2b)。

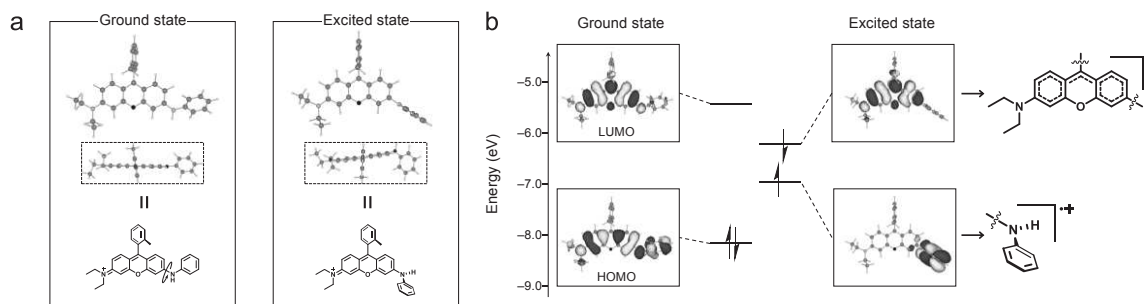


Figure 2. (a) Energy minimized structure of Ph-DER in ground state (left) or excited state (right). (b) Comparison of molecular orbitals of Ph-DER in ground and excited states. All calculations were performed at B3LYP/6-31G* level.

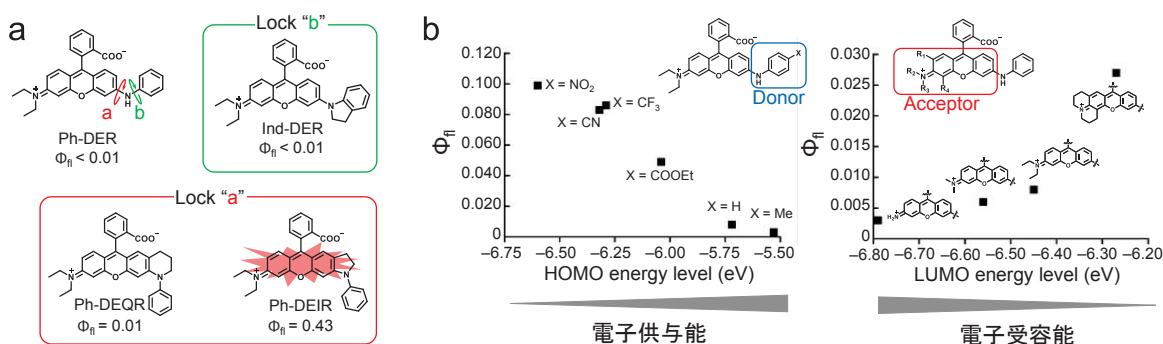


Figure 3. (a) Chemical structures and fluorescence quantum yields (in methanol) of the “locked” derivatives of Ph-DER bearing various bridged structures. (b) HOMO energy level of donor structures (left) and LUMO energy level of acceptor structures (right)-dependent change in fluorescence quantum yields (in ethylene glycol). Φ_f is the relative fluorescence quantum yield determined by using rhodamine B in ethanol ($\Phi_f = 0.65$) as a fluorescence standard.

そこでこの仮説を検証するため、「結合のねじれ(twist)」と「ICT」の二つに着目して誘導体を合成し、それらの光学特性を精査した。まずキサテン環-N原子間の結合の「twist」の影響に関して検討を行うため、分子内に架橋構造を導入した誘導体を合成・評価した。その結果、キサテン環-N原子間の結合を五員環構造によって架橋した誘導体 Ph-DEIR においてのみ強蛍光性になることを見出した(Fig. 3a)。これにより蛍光消光において「twist」が重要であることが支持された。さらに「ICT」の影響について調べるため、分子内電荷移動における donor 構造に相当するアニリン様構造及び acceptor 構造に相当するキサテン構造を様々に変化させた誘導体群を合成・評価した。その結果、donor 構造の電子供与能が高いほど、また acceptor 構造の電子受容能が高いほど蛍光量子収率が低下することが分かり(Fig. 3b)、蛍光消光において「ICT」が重要であることが支持された。

以上の実験結果から、「N-Ph rhodamine 類に

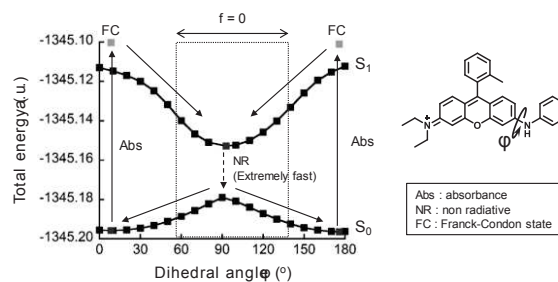


Figure 4. A model of the quenching mechanism of N-Ph rhodamine dyes. Geometries were optimized at B3LYP/6-31G* level.

において光励起によってキサンテン環-N 原子間の結合のねじれが生じ ICT 状態を形成した後、高速の無輻射過程によって素早く基底状態へと戻る」と考察することができる (Fig. 4)。

【HaloTag 検出赤色蛍光プローブの開発】

これまでの検討から *N*-Ph rhodamine 類は励起状態における「結合のねじれ」によって消光することが示唆された。この特性を利用することで、標的タンパク質との結合により「結合のねじれ」を抑制し蛍光性へと変化する蛍光プローブの新たな分子設計法になり得ると考えた (Fig. 5a)。具体的な標的分子として、タグタンパク質として汎用されている HaloTag® に着目した。HaloTag とは、クロロアルカン構造 (HaloTag リガンド) を有する有機小分子と共有結合を形成する改変酵素であり、観察したいタンパク質と HaloTag を融合することで標的タンパク質の局在や発現量の変化などを解析できる。HaloTag と結合することで無蛍光性から蛍光性へと変化する蛍光プローブを開発することで、サンプル数の多い生化学実験等においてしばしば問題になる未反応の蛍光プローブの「洗浄操作」を行うことなく、タンパク質の動的な挙動を解析することができる。

上記の考えに基づき、*N*-Ph rhodamine の N 原子に HaloTag リガンド構造を導入した Halo rhodamine-2 を分子設計・合成した (Fig. 5b)。Halo rhodamine-2 は HaloTag との反応により約 10 倍の蛍光増大を示したものの、その蛍光量子収率は HaloTag 結合時でも 0.09 と十分な大きさではなかった。この蛍光量子収率の低さを改善するため、消光機構の解析により得られた知見を基に *N*-Ph rhodamine のキサンテン環の構造 (acceptor 構造) を変化させた Halo rhodamine-4 を分子設計・合成した (Fig. 5b)。この誘導体化により HaloTag との反応時における蛍光量子収率を 0.33 と向上させることに成功した。さらに HaloTag を細胞表面に一過性に発現させた HEK293T 細胞に Halo rhodamine-4 を添加したところ、10 分程度で

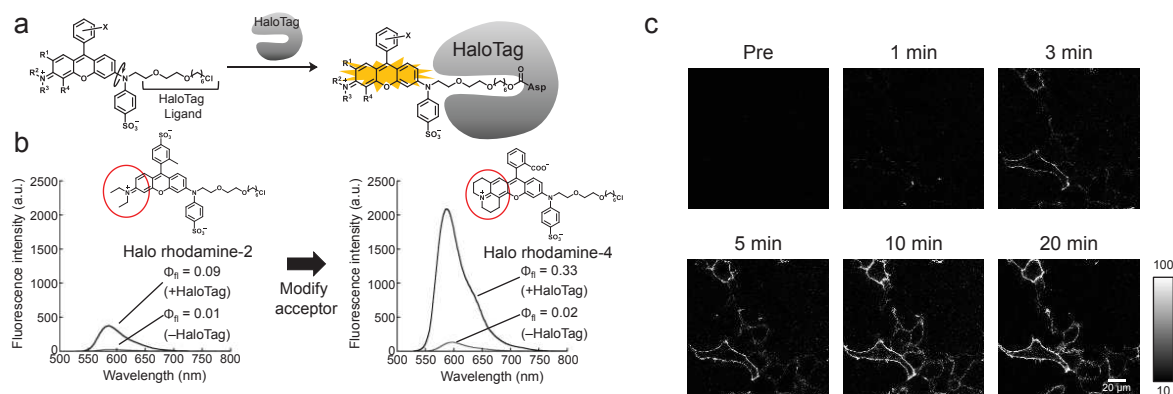


Figure 5. (a) Design strategy for fluorescence probes for HaloTag protein. (b) Fluorescence spectra of Halo rhodamine-2 and Halo rhodamine-4 (1 μM) in PBS before and after reaction with 2 μM HaloTag protein. (c) Fluorescence imaging of transiently HaloTag-expressed HEK293T cells by using Halo rhodamine-4.

HaloTag が選択的に蛍光ラベル化され、洗浄操作を行うことなく蛍光顕微鏡にて HaloTag を観察することに成功した(Fig. 5c)。以上のように、*N*-Ph rhodamine の消光機構を基に実用的な HaloTag 検出蛍光プローブの開発に成功した。

【SNAP-tag 検出赤色蛍光プローブの開発】

「結合のねじれ」の抑制により標的タンパク質との「結合」を検出する分子設計戦略は、HaloTag のみならず、他の標的生体分子への応用も可能であると考えられた。そこで、この分子設計戦略の汎用性を示すため、汎用されるタグタンパク質の一つである SNAP-tag を検出する蛍光プローブの開発を行った。具体的には SNAP-tag のリガンドである benzylguanine 構造を *N*-Ph rhodamine の N 原子に導入した SNAP rhodamine-4 を分子設計・合成した(Fig. 6a)。SNAP rhodamine-4 は SNAP-tag との反応により約 10 倍の蛍光増大を示し、これを用いて細胞膜表面に発現した SNAP-tag を洗浄操作することなく蛍光顕微鏡下にて観察することに成功した(Fig. 6b)。このように、「結合のねじれ」を制御した分子設計戦略の汎用性を示すことに成功した。

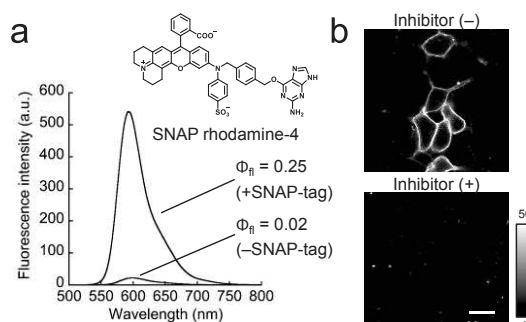


Figure 6. (a) Fluorescence spectra of SNAP rhodamine-4 (1 μ M) in PBS before and after reaction with 2 μ M SNAP-tag protein. (b) Fluorescence imaging of SNAP-tag-expressed HEK293T cells by using SNAP rhodamine-4. Inhibitor (SNAP-Surface Block) was also added 20 min before the addition of SNAP rhodamine-4 (inhibitor (+)).

【まとめと今後の展望】

本研究では、*N*-Ph rhodamine 類の無蛍光性を「キサントゲン環-N原子間の結合のねじれに付随して生じる ICT 状態の形成」により説明できることを見出し、その知見を基に実用的な HaloTag 及び SNAP-tag を検出する蛍光プローブの開発に成功した。*N*-Ph rhodamine 類の「ねじれ」の抑制を利用した分子設計戦略は、内在性のタンパク質、DNA、RNA 等にも応用可能な汎用性の高い手法であり、今後の生命科学研究の発展に貢献すると期待される。

【参考文献】 (1) Lee, J. *et al.* *ACS Chem. Biol.* **2010**, *11*, 1065. (2) Peng, T. *et al.* *Org. Lett.* **2010**, *12*, 4932. (3) Tredwell, C. J. *et al.* *J. Chem. Soc. Faraday Trans. II* **1980**, *76*, 1627.