

# 論文の内容の要旨

論文題目 : Si 置換フルオレセインの化学平衡の解析  
および蛍光プローブ開発への応用

氏名: 平林 和久

## 【序論】

フルオレセイン (Figure 1a) はその高い水溶性、高い蛍光量子収率、確立された蛍光の off/on 制御法などから、蛍光プローブの母核として汎用されている代表的な緑色蛍光団である。その分子構造において、ベンゼン環部位 2 位のカルボキシ基は、高い水溶性を付与するとともに、弱酸性環境においてキサントレン環部位の 9' 位への求核攻撃によって分子内スピロクトン環を形成し、無色・無蛍光の互変異性体を生じる (Figure 1b)。このような分子構造の変化は多くの研究者の興味を引き、古くから互変異性と酸塩基平衡を含むフルオレセインの化学平衡は研究されてきた。本研究においては、フルオレセインのキサントレン環 10 位の O 原子を Si 原子に置換した Si 置換フルオレセイン、すなわち、ベンゼン環部位 2 位にカルボキシ基を有する TokyoMagenta (TM) 類 (2-COOH TM) (Figure 1a) に着目し、そのフルオレセインとは大きく異なる pH 依存的な化学平衡の解析および、その特徴を活かした新たな蛍光プローブの分子設計法の確立を目指した。

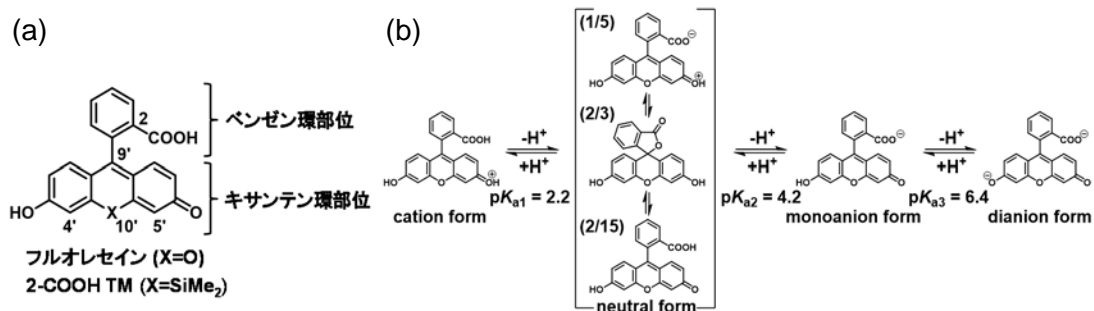


Figure 1. (a) Chemical structures of Fluorescein and 2-COOH TM. (b) Chemical equilibrium of Fluorescein.

## 【本論】

### 1. 2-COOH TM の化学平衡式の解析

まず、2-COOH TM を合成し、その光学特性の精査を行った。その結果、フルオレセインは酸性から中性において吸収スペクトルの形状が大きく変化するのに対し (Figure 2a)、2-COOH TM は酸性から中性においては可視光領域には光の吸収を持たず、塩基性になるに従い 580 nm の吸光度が上昇するという特徴的な吸収スペクトル変化を示した (Figure 2b)。特に、2-COOH TM は Figure 2c に示すような鋭い pH 依存的な吸光度変化を示すことが分かった。この吸光度の変化は、二相性のフィッティング式で解析でき、pH7-9 の間に 2 段階の酸解離 ( $pK_{a1} = 8.2$ ,  $pK_{a2} = 7.9$ ) かつ  $pK_{a1} > pK_{a2}$  であることが、pH 依存的な鋭い吸光度変化の原因であった。ただし、ここでいう  $pK_{a1}$  は総電荷 0 の構造の濃度の和と総電荷-1 の構造の濃度の和が等しいときの pH、 $pK_{a2}$  は総電荷-1 の構造の濃度の和と総電荷-2 の構造の濃度の和が等しいときの pH を示す値である。これら  $pK_{a1}$ 、 $pK_{a2}$  は、キャピラリー電気泳動法を用いた解析からも同じ値が算出された。

そこで、上記の特性をさらに調べるため、2-COOH TM の化学平衡式の決定を行った。まず、2-COOH TM のベンゼン環部位 2 位のカルボキシ基を Me 基に置換した 2-Me TM の吸収スペクトルを測定した (Figure 2c,d,e)。その結果、582 nm に極大吸収を持つ anion form と 472 nm に極大吸収を持つ neutral form の 1 段階の酸解離 ( $pK_a = 6.8$ ) が存在し、pH 7 においても大きな 582 nm の吸収を示した。したがって、酸性から pH 7 において 2-COOH TM が可視光領域に吸収を持たないのは、ベンゼン環部位 2 位のカルボキシ基に起因する分子内スピロラ

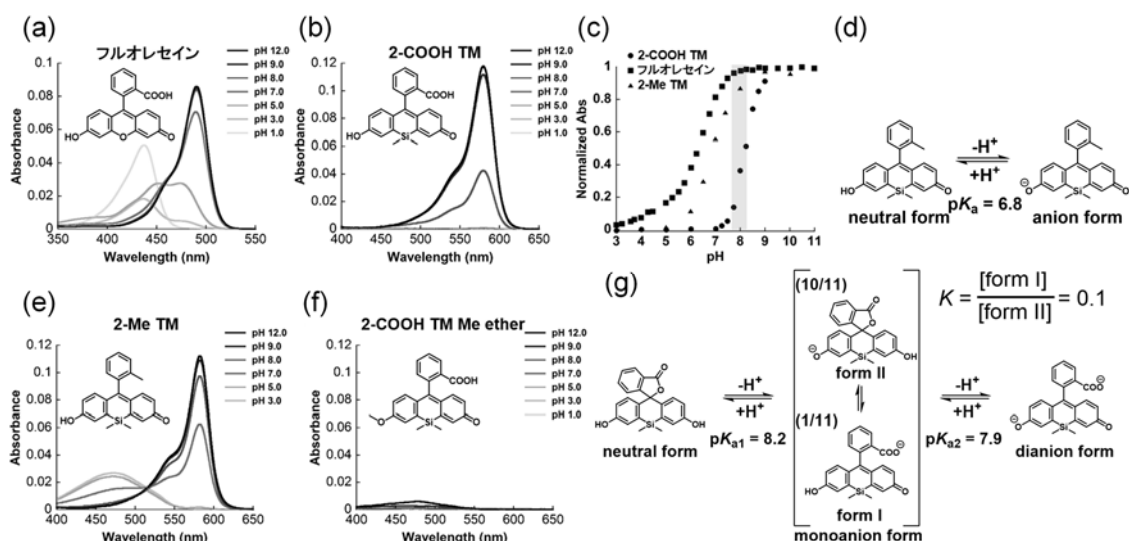


Figure 2. pH-Dependency of absorption spectra of (a) Fluorescein and (b) 2-COOH TM. (c) pH Plot of normalized absorbance at 580nm for 2-COOH TM, 494nm for Fluorescein and 582 nm for 2-Me TM. (d) Chemical equilibrium of 2-Me TM. (e) pH-Dependency of absorption spectra of 2-Me TM. (f) pH-Dependency of absorption spectra of 2-COOH TM Me ether. (g) Estimated chemical equilibrium of 2-COOH TM.

クソン構造の形成のためと考えられる。一方、pH 10 以上において、2-COOH TM の吸収極大波長およびモル吸光係数が 2-Me TM と等しかったことから、pH 10 以上においては、2-COOH TM のキサンテン環部位は 2-Me TM の anion form (Figure 2d) と同じ構造であると推定された。また、neutral form と monoanion form 間の化学平衡のモデルとして 2-COOH TM のメチルエーテル体の化合物の pH 依存性を測定したところ、そのモル吸光係数は小さいながらも、2-Me TM の neutral form (Figure 2d) に対応する 472 nm に吸収極大を示す吸収スペクトルが観察された (Figure 2f)。つまり、Figure 2g の化学平衡式の monoanion form に示す form I と form II の平衡が存在することが考えられた。以上の測定データから、2-COOH TM の化学平衡式を Figure 2g のように推定し、 $pK_{a1}$  および  $pK_{a2}$ 、monoanion form の form I と form II の平衡定数  $K$  を決定した。

さらに、キサンテン環部位における置換基の効果を検討した。具体的にはキサンテン環部位に Cl 基または F 基を導入した化合物を合成し、それらの pH 依存的な吸光度変化を測定した (Figure 3a,b)。その結果、2-COOH TM のキサンテン環部位にこれら電子吸引性基を導入することで、2 つの見かけの酸解離定数  $pK_{a1}$ 、 $pK_{a2}$  を低下させ、生理的 pH においても強い赤色光領域の吸収および蛍光を示すことが分かった (Figure 3c)。また、一般に 2-Me TM (Figure 2d) のように、1 段階の酸解離を示す化合物において、pH が  $pK_a$  周辺で 1 変化した際の吸光度変化は約 3-5 倍程度にあるのに対して、2-COOH DCTM は pH が 6 から 7 に 1 変化するだけで約 13 倍の大きな吸光度変化を示すことが明らかになった (Figure 3b)。

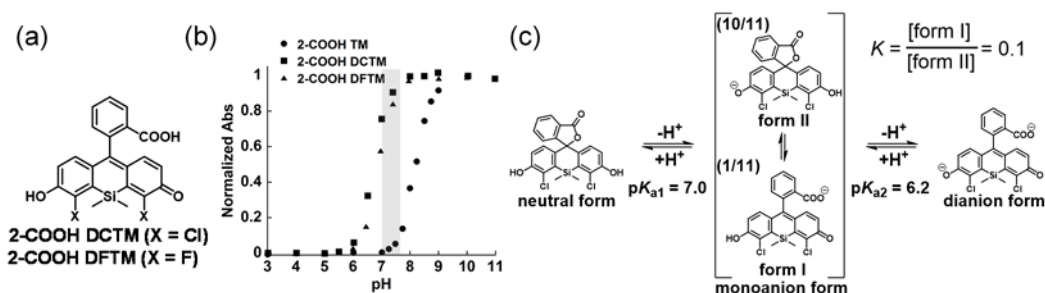


Figure 3. (a) Chemical structures of 2-COOH DCTM and 2-COOH DFTM. (b) pH Plot of normalized absorbance at 580nm for 2-COOH TM, 591 nm for 2-COOH DCTM and 581nm for 2-COOH DFTM. (c) Chemical equilibrium of 2-COOH DCTM.

次に、2-COOH DCTM のベンゼン環部位における置換基の効果を検討した。2-COOH DCTM の 5 種類の誘導体を合成し、その pH 依存的な吸光度変化を測定した (Figure 4a,b)。その結果、導入した置換基のベンゼン環部位の 2 位カルボン酸に対する Hammett 定数  $\sigma$  に依存して  $pK_{a2}$  は 1.3 もの大きな変化を示したのに対し、 $pK_{a1}$  は大きな変化を示さず (Figure 4a,c)、また  $pK_{a2}$  の上昇した誘導体では、吸光度の pH 依存的な変化は緩やかとなることが明らかとなった (Figure 4b)。

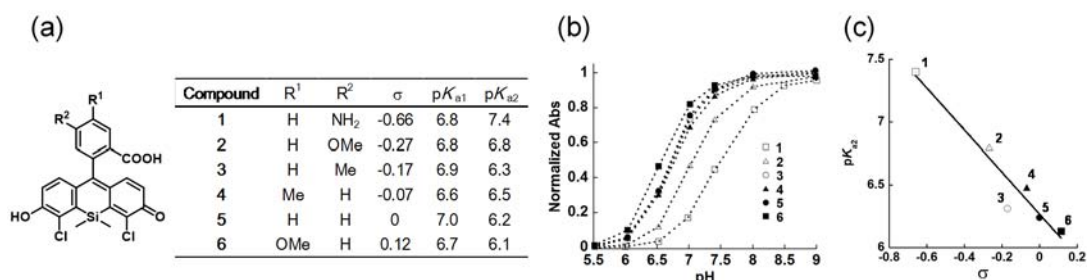


Figure 4. (a) Chemical structures of 2-COOH DCTM derivatives and their pK<sub>a</sub>s. (b) pH Plot of normalized absorbance of 2-COOH DCTM derivatives at 591 nm. (c) Correlation between pK<sub>a2</sub> and  $\sigma$ .

## 2. 2-COOH DCTM の蛍光プローブへの応用

生理的条件下 (pH 7.4) において強い可視光の吸収および蛍光を持つ 2-COOH DCTM を赤色蛍光プローブへと応用した。まず、代表的な蛍光制御原理である光誘起電子移動を原理とした Ca<sup>2+</sup> 蛍光プローブを開発し (Figure 5a)、生細胞 Ca<sup>2+</sup> 応答の高感度検出に成功した。次に、2-COOH DCTM のフルオレセインには見られなかった特性である分子内ラクトン環の形成のし易さを利用して、レポータータンパク質として汎用されている  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の検出蛍光プローブの開発を行った (Figure 5b)。開発したプローブは生理的 pH においてほぼ無色・無蛍光性の分子内スピロラクトン構造を示し (Figure 4c)、 $\beta$ -ガラクトシダーゼとの反応によって基質部位が切断されることで、大きな吸光度および蛍光強度の上昇を示した。

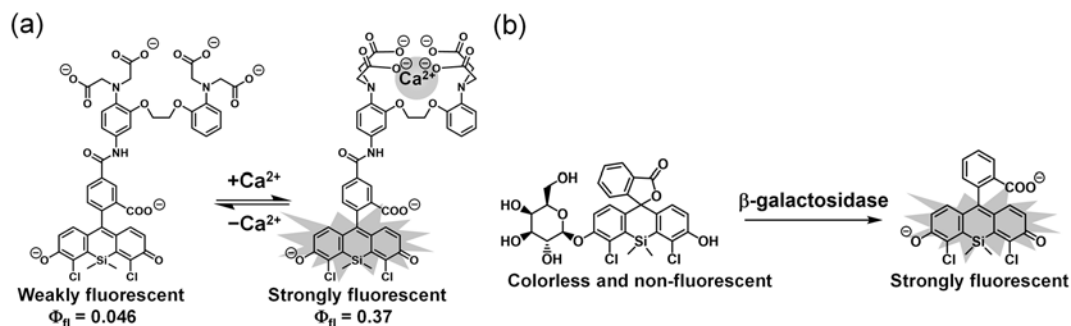


Figure 5. (a) Reaction scheme of Ca<sup>2+</sup> probe. (b) Reaction scheme of  $\beta$ -galactosidase probe.

## 【結論】

本研究において、Si 置換フルオレセインである 2-COOH TM が、フルオレセインとは大きく異なる特徴的な化学平衡を示すことを見出した。さらに、生理的条件下で強い吸収・蛍光を示す 2-COOH DCTM が、赤色蛍光プローブへと応用できることを示した。今後、本分子のこれまでにない特徴的な構造変化を活かし、新たな蛍光プローブが開発されることが期待される。