

## 保護／脱保護化学に基づく蛍光プローブの設計開発

過酸化水素，スーパーオキシド，チオールおよびセレノールの可視化計測

前田 初男

さまざまな蛍光プローブがすでに開発されている。それらは、可視化したい各々のターゲット分子に対して独立して立案された戦略に基づき設計されている。したがって、あるプローブの開発に有効であった戦略を、別のターゲット分子に対するプローブの設計に用いるのは一般に困難である。現在、Chemical Biologyの重要な領域をなす可視化科学に対するニーズはますます多様性を増している。このニーズに容易かつ迅速に答えるためにはさまざまなプローブの設計に共通して利用できる戦略の確立が重要だと思われる。この考えに基づき、著者らは保護／脱保護化学に基づく蛍光プローブの汎用型設計戦略を立案した。この戦略では、フェノール性水酸基を持つ蛍光色素ならびに保護基の組み合わせを選択することにより、ターゲット分子に特異的な反応に基づく脱保護反応を蛍光 on-off 機構とする多様なプローブを開発できると期待される。事実、この戦略に基づき、過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )、スーパーオキシド ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )、チオールおよびセレノールに特異的な蛍光プローブの設計開発に成功した。本稿では、この興味深いプローブ設計戦略ならびに開発した蛍光プローブの特性などについて紹介する。

## 保護／脱保護化学に基づく蛍光プローブ設計戦略

$\text{H}_2\text{O}_2$  が  $\alpha$  効果により水に比べて著しく強い求核性を示すため、酢酸フェニル類の加過酸化水素分解は、その加水分解より非常に速い<sup>2)</sup>。この事実に基づき、蛍光色素 resorufin のアシル化体が  $\text{H}_2\text{O}_2$  プローブとして利用できると考え、種々検討した (図1, eq. 1)<sup>3-5)</sup>。その結果、acyl resorufin 類が  $\text{H}_2\text{O}_2$  の高感度蛍光分析に発蛍光試薬として利用できることを見いだした。また、蛍光色素 fluorescein (3) (図1) 類のアシル化体を用いても  $\text{H}_2\text{O}_2$  計測を同様に行えることも明らかにしている (未発表)。当初期待していた細胞系へ適用できる新規  $\text{H}_2\text{O}_2$  プローブの開発は、これらのアシル化体がエステラーゼによって容易に加水分解されることから、不成功に終わった。しかし、得られた知見から以下の作業仮説を立案できた。もし、フェノール性水酸基を持つ蛍光色素において、その水酸基の保護／脱保護反応により蛍光 on-off が制御

でき、脱保護反応がターゲット分子に特異的な反応により誘起されるならば、その保護体がターゲット分子に対する特異的なプローブになる。この作業仮説から、図1, eq. 2 に示すような保護／脱保護化学に基づく蛍光プローブ設計戦略を立てた。これまで脱保護反応を蛍光 on-off 機構とするプローブがないわけではない。3 などのフェノール性水酸基を有する蛍光色素について、それらの水酸基を修飾することにより人工基質に変換したものである。フォスファターゼやガラクトシダーゼの酵素アッセイやイメージングに利用されるプローブがその例である。しかし、化学的な脱保護反応を蛍光 on-off 機構として利用するプローブはこれまで存在しなかった。

著者らが立てたプローブ設計戦略の基盤化合物として 3 の benzenesulfonyl (BES) 化体 1 および 2 (図1) に着

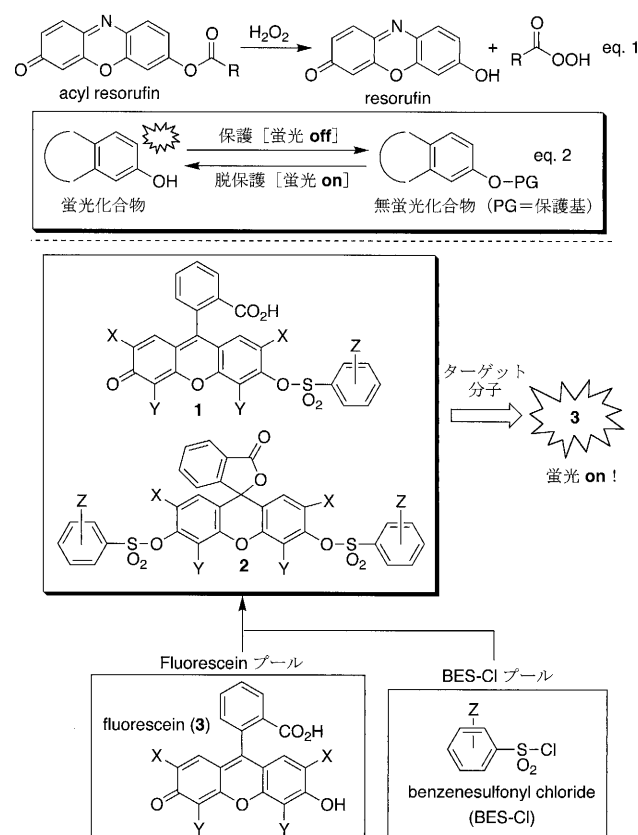


図1. 保護／脱保護化学に基づく蛍光プローブ設計戦略

著者紹介 大阪大学大学院薬学研究科分子薬科学専攻 (助教授) E-mail: h-maeda@phs.osaka-u.ac.jp

目した。これは以下の4つの基盤概念に基づく。①エステルに比べてスルホン酸エステルはエステラーゼの基質になりにくい(細胞系に適用できる)。②多種多様な化学的反応性を示す**1**および**2**が、**3**ならびにBES chlorideの組み合わせを各々の化合物プールから選択することにより設計合成できる(**3**の骨格上およびBES基のbenzene環上への化学的的特性の異なる置換基の導入により**1**および**2**の化学的反応性が制御できる)。③同じBES基を保護基として用いても保護様式つまり**1**と**2**を使い分けることにより化学的反応性を制御できる(**1**の方が脱保護され易い)。④水溶性の向上は、親水性基が残っている**1**を用いることにより達成できる。これらの概念は期待以上に機能し、**1**および**2**を基盤化合物として活用することにより異なるターゲット分子に非常に特異的な蛍光プローブを設計開発することができた。以下、個々のプローブについてその特性などを記す。

### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> プローブ

多種多様な**3**およびBES-Clが構成する化合物プールからdifluorofluorescein(**3c**)とpentafluorobES-Clを選択することにより、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>蛍光プローブとして**1c**(図2)を開発できた<sup>6)</sup>。ほぼ無蛍光の**1c**はH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>と反応し、強い蛍光を持つ**3c**へ効果的に変換される。この脱保護反応はH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によって特異的に誘起される。O<sub>2</sub><sup>•-</sup>、ヒドロキシルラジカル(HO<sup>•</sup>)、*t*-ブチルヒドロペルオキシド(*t*-BuOOH)、一重項酸素(<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)、一酸化窒素(NO<sup>•</sup>)、ペルオキシナイトライト(ONOO<sup>-</sup>)に対して**1c**はほとんど応答を示さない。期待したとおり、エステラーゼに対しても安定である。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>プローブとしてdichlorodihydrofluorescein(DCFH)<sup>7)</sup>が汎用されている。しかし、その蛍光on-off機構は酸化反応であるため、DCFHはH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>だけでなく他の活性酸素種や酸化酵素に対しても応答を示す<sup>7,8)</sup>。DCFHに比べて**1c**がH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>に対して非常

に高い特異性を示したのは、蛍光on-off機構として酸化反応ではなく加過酸化水素分解による脱保護反応を活用したことに由来する。

**1**のアセチル化体BESH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(図2)を用いれば細胞内H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を選択的に可視化できる。モデル細胞として淡水性緑藻*Chlamydomonas reinhardtii*を用いて検討した。これは、この緑藻では光照射下で刺激剤を使い分けることにより任意の活性酸素種を恣意的に発生することができるからである。その結果、BESH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の細胞内H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>プローブとしての有用性が示された。すなわち、暗条件下、室温で30分間処理することによりBESH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を負荷した緑藻を、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を発生する刺激剤・Cu<sup>2+</sup>添加培地中、光照射下培養した時のみ、刺激剤濃度に依存した蛍光応答が得られた。このような特異性はDCFHのジアセチル化体DCFH-DAにはまったく観察されなかった。

また、BESH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を用いることにより、酪酸刺激により誘導されるJurkat T細胞における細胞内H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>産生<sup>9)</sup>を可視化できた(未発表)。終濃度5 μM BESH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を含む培地中で1時間培養した後、5 mM酪酸共存下および非共存下でさらに1時間培養したときに観察された位相差像および蛍光像を図3に示す。DCFH-DAに比べて非常に特異性が高いだけでなく、細胞系へも適用できるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>プローブBESH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>は活性酸素研究における新しいツールとして活用されるものと大いに期待している。なお、BESH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>は和光純薬工業からすでに市販されている。

### O<sub>2</sub><sup>•-</sup>プローブ

**3**およびBES-Clとして各々tetrafluorofluoresceinおよび2,4-dinitroBES-Clから合成した**2d**(図4)がO<sub>2</sub><sup>•-</sup>プローブとして利用できることを見いだした<sup>10)</sup>。**2d**は活性酸素種の中ではO<sub>2</sub><sup>•-</sup>に対して非常に高い特異性を示す。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、*t*-BuOOH、NaOCl、HO<sup>•</sup>、<sup>1</sup>O<sub>2</sub>、NO<sup>•</sup>およびONOO<sup>-</sup>に対してほとんど応答を示さない。その結果、phorbol myristate acetate(PMA)刺激した好中球が細胞外に産生するO<sub>2</sub><sup>•-</sup>を**2**を用いることにより感度よく検出できた。この時観察された応答がO<sub>2</sub><sup>•-</sup>由来であることは、スーパーオキシドジスムターゼの添加実験により確認した。

また、マウスを用いた*in vivo*心筋虚血モデルに適用したところ、虚血再灌流時における酸化バーストを**2d**を用いることにより良好にイメージングできた(未発表)。20 mM DMSO溶液を腹腔内注射し1時間放置することにより**2d**を負荷、開胸後、冠動脈を結紮し1時間虚血、再灌流を5または7分行い再結紮し摘出、という操作により

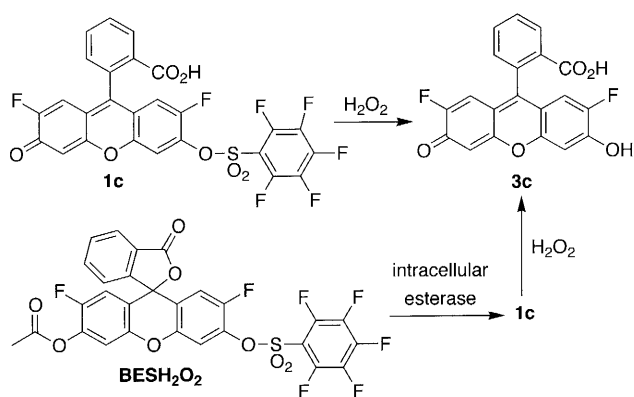


図2. 細胞外および細胞内過酸化水素プローブ

## 特 集

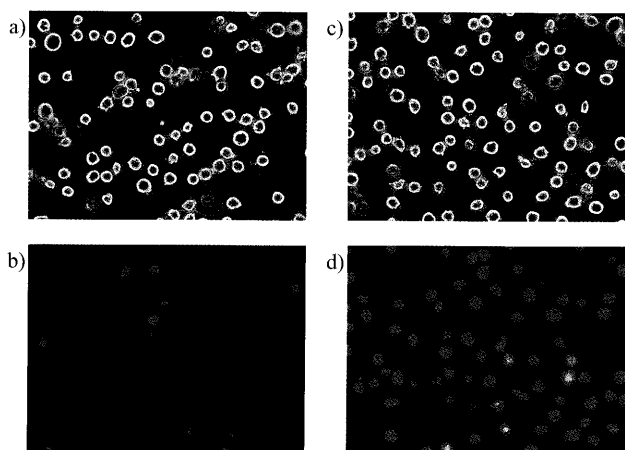


図3. BESH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を用いたJurkat T細胞におけるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>産生の可視化. a, b) 無刺激, c, d) 酢酸刺激. a, c) 位相差像, b, d) 蛍光像.

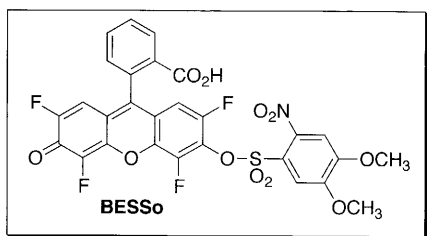
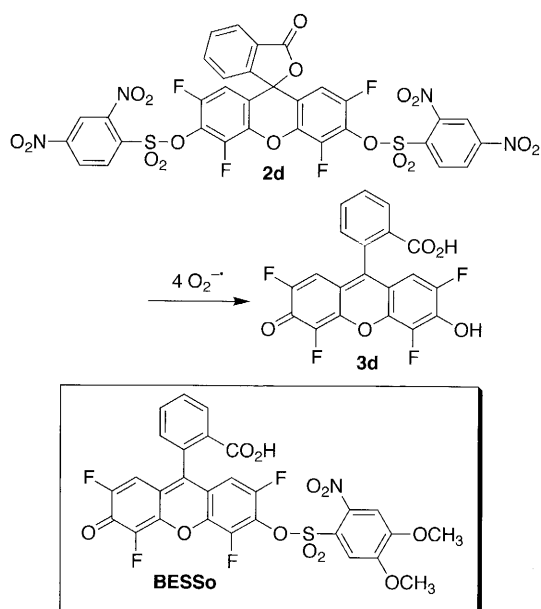


図4. スーパーオキシドプローブ

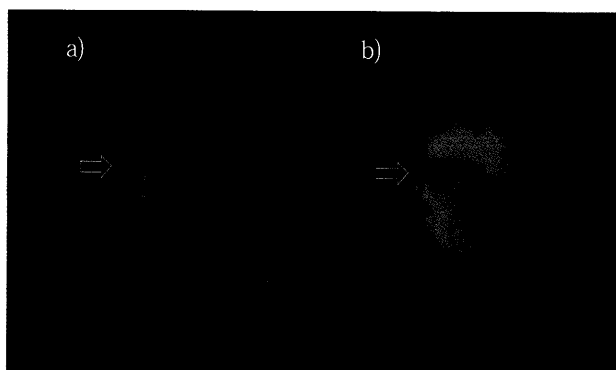


図5. 2dを用いた虚血再灌流時におけるマウス心臓における酸化バーストの可視化. a) 再灌流5分後, b) 7分後に摘出した心臓の蛍光像. ⇒は冠動脈の結紮箇所.

得たマウス心臓の蛍光像が図5である. 再灌流を7分行くと結紮部位の下流領域においてO<sub>2</sub><sup>•-</sup>異常産生に基づく酸化バーストが惹起されることが示された.

しかし, 2dは, 水溶性が低だけでなく, glutathione (GSH) や還元酵素系に対して無視できないレベルで蛍光応答を与える. 特に, GSHは細胞内にmMレベルで存在するため, 細胞内O<sub>2</sub><sup>•-</sup>の可視化に2dを適用する場合, GSHの影響を考慮する必要がある. そこで, より実用的な細胞内O<sub>2</sub><sup>•-</sup>プローブの分子設計をさらに行った. その結果, GSHにもまったく応答を示さないO<sub>2</sub><sup>•-</sup>特異的プローブとしてBESSo (図4)の開発に成功した(投稿準備中). BESSoを用いることによりPMA刺激した好中球が産生するO<sub>2</sub><sup>•-</sup>をより高感度に検出できた. また, 2dに比べて親水性の高いモノ保護体であるBESSoは希釈水溶液としても使用し易いという利点も持つ. なお, 2dやBESSoの蛍光on-off機構は, スルホン酸エステルに対するO<sub>2</sub><sup>•-</sup>の求核置換による脱保護反応であると推定している. O<sub>2</sub><sup>•-</sup>の蛍光可視化はこれまでhydroethidine (HE)を用いて行われてきた<sup>11)</sup>. しかし, その蛍光on-off機構はO<sub>2</sub><sup>•-</sup>による酸化に基づくため, DCFHと同様に特異性に問題がある<sup>11)</sup>. HEの問題点を克服する高特異的O<sub>2</sub><sup>•-</sup>蛍光プローブBESSoは, BESH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>とともに, 活性酸素研究や機能性食品研究の発展に貢献すると信じてやまない.

## チオールプローブ

O<sub>2</sub><sup>•-</sup>プローブの開発過程に得た知見に基づき, 新規高感度チオールプローブとしてBESThio (図6)の開発に成功した<sup>12)</sup>. このものの設計は, 3cや3dよりフェノール性水酸基の酸性度が低い2,7-dimethylfluorescein (3e)を選択することにより芳香族求核置換反応を受け易くする, という戦略に基づいている. これまでにさまざまなチオール蛍光プローブが開発されている<sup>1)</sup>. しかし, アミン類などの求核性化合物に応答を示す可能性が高い, 水溶性が低い, などの問題点がある. 一方, BESThioは,

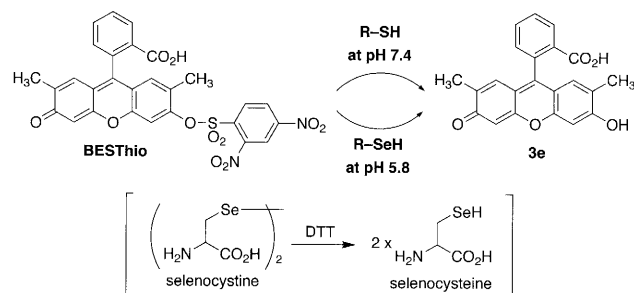


図6. pH制御によりチオールまたはセレンオール蛍光プローブとして機能するBESThio

アミン類やアルコール類に対してまったく応答を示さないだけでなく、親水性の高いモノ保護体であるため高度に希釈した水溶液として利用できる。その結果、アセチルまたはブチリルチオコリンを基質として用いるコリンエステラーゼアッセイも BESThio を用いて構築できた<sup>12)</sup>。このアッセイは、アルツハイマー型痴呆症治療薬として近年注目されているコリンエステラーゼ阻害剤の高感度簡便スクリーニング法としても利用できる。アリセプトとして世界中で汎用されているアルツハイマー型痴呆症治療薬ドネペジルについてコリンエステラーゼ阻害活性を測定した。その結果、ドネペジルがブチリルコリンエステラーゼに比べて400倍以上の選択性を持つアセチルコリンエステラーゼ特異的阻害薬であることを簡便に再確認できた。他のチオール定量に基づく蛍光酵素アッセイも BESThio を活用することにより開発できると考えている。なお、BESThio は和光純薬工業から近日発売予定である。

### セレノールプローブ

BESThio は pH 5.8 ではチオールにはほとんど応答を示さない。これは、弱酸性条件下ではチオールが求核剤として作用できないためである。一方、チオールに比べて酸性度および求核性の高いセレノールは、弱酸性領域においても求核剤として作用する<sup>13)</sup>。その結果、BESThio は pH 5.8 ではセレノールプローブとして機能する(図6)<sup>14)</sup>。BESThio は、過剰のチオール系還元剤 dithiothreitol (DTT) 共存下 selenocystine から発生する selenocysteine (SeCys) を、DTT に妨害されることなく高感度に検出できる。また、BESThio は、セレノプロテイン (SeP) である glutathione peroxidase (GPx, ウシ赤血球由来) および thioredoxin reductase (TrxR, ラット肝由来) の SeCys 残基数決定にも利用できた。前者はホモテトラマー、後者はホモダイマーであるが、両者とも subunit あたり SeCys 残基を一つ持つ。4 M guanidine 共存下 37°C で 30 分間培養し変性、このサンプルに DTT および BESThio を添加し 37°C で 20 分培養、という簡便な操作でアッセイが行える。このアッセイにより、数十  $\mu\text{g/ml}$  の GPx および TrxR について各々  $1.03 \pm 0.14$  および  $1.09 \pm 0.19$  SeCys/subunit という理論値とよく一致する結果が得られた。なお、変性操作なしではまったく蛍光応答

は得られなかった。

セレンは酸化ストレスに対する生体防御機構を担う微量必須元素である。生体内における含セレン化学種は主に SeCys である。SeCys は遺伝子産物である SeP の構成アミノ酸であり、これまで約 35 種の SeP が同定またはその存在が推定されている<sup>15)</sup>。すべての SeP が重要な生物機能を担っていると推測されているが、未だその機能の詳細が不明な SeP も多い。しかし、SeP が担う機能のキープレイヤーは間違いなく SeCys 残基のセレノールである。したがって、SeCys の簡便な分析法は SeP の機能・構造解析研究に不可欠である。しかし、これまでセレノール蛍光プローブはまったく開発されていなかった。BESThio は世界最初のセレノールプローブである。

### おわりに

以上、著者らがこれまでに保護/脱保護化学に基づき開発した蛍光プローブについて解説した。BESH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、BESSo ならびに BESThio は、感度、特異性ならびに物性の観点から実用性の高い蛍光プローブとして利用できると考えている。今後、生物工学会員諸氏のご批判をあおぎつつ、これらのプローブをより実用的なものへと育てていくとともに、他の生体分子に対する蛍光プローブを同様な戦略に基づき開発していく所存である。

### 文 献

- 1) Haugland, R. P.: *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, 9th ed., Molecular Probes, Eugene (2002).
- 2) Bartoli, G. and Todesco, P. E.: *Acc. Chem. Res.*, **10**, 125 (1977).
- 3) Maeda, H. *et al.*: *Chem. Pharm. Bull.*, **49**, 294 (2001).
- 4) Matsuura, S. *et al.*: *Bunseki Kagaku*, **50**, 475 (2001).
- 5) Maeda, H. *et al.*: *Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 169 (2002).
- 6) Maeda, H. *et al.*: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43**, 2389 (2004).
- 7) Tarpey, M. M. and Fridovich, I.: *Circ. Res.*, **89**, 224 (2001).
- 8) 前田初男: *ぶんせき*, **11**, 643 (2002).
- 9) Kurita-Ochiai, T. *et al.*: *J. Immunol.*, **171**, 3576 (2003).
- 10) Maeda, H. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 68 (2005).
- 11) Müzel, T. *et al.*: *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **22**, 1761 (2002).
- 12) Maeda, H. *et al.*: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, 2922 (2005).
- 13) Jacob, C. *et al.*: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **42**, 2742 (2003).
- 14) Maeda, H. *et al.*: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 1810 (2006).
- 15) Rayman, M. P.: *Lancet*, **356**, 233 (2000).