



2022年10月11日

報道関係者各位

慶應義塾大学薬学部

消光団分子の「ねじれ」の制御による

新たな蛍光プローブの分子設計法の確立

— 迅速な病態部位の検出など次世代臨床医療への展開へ期待 —

慶應義塾大学薬学部の花岡健二郎教授らの研究グループは、消光団と呼ばれる無蛍光性の色素であるフェニルローダミン類の無蛍光メカニズムを初めて解明しました。生体内での生命現象のリアルタイムかつ高感度な可視化のためには、細胞や身体の組織などを蛍光でマークし、生きたまま観察できる蛍光イメージングは無くてはならない技術となっています。その蛍光イメージングを達成するためには、観察したい生体分子を認識して蛍光が off から on へと切り替わる蛍光プローブ（注1）は必要不可欠です。一方、消光団は近傍の蛍光色素の蛍光を消すことができる色素分子であり、酵素活性を検出する蛍光プローブの一部として汎用されてきました。これまでにこの消光団は蛍光プローブの開発に使用されてきた一方で、その無蛍光性のメカニズムについては明らかにされてきませんでした。

そこで今回、誘導体の合成およびそれらの光学特性の精査、計算化学によって、その無蛍光性のメカニズムを初めて解明することに成功しました。それによって、従来のものとは質的に異なる新たな蛍光プローブの分子設計（注2）法を提案することに成功しました。この分子設計法により、標的とする蛋白質へと結合するだけで蛍光を発する蛍光プローブの精密分子設計が可能となり、病態で高発現する蛋白質に結合して発蛍光する蛍光プローブを開発することで、病態の蛍光による迅速な可視化が可能になることが期待されます。

本研究成果は、2022年10月3日（米国東部時間）に国際学術誌『Journal of the American Chemical Society』オンライン版に掲載されました。

1. 本研究のポイント

- ・無蛍光性の消光団であるフェニルローダミン類の無蛍光性のメカニズムを解明することに初めて成功した。
- ・本知見を用いることで、従来とは異なる新しい蛍光プローブの分子設計法が可能となった。
- ・特定の蛋白質との結合によって蛍光が off から on へと変化する蛍光プローブの開発へと応用され、病態部位の蛍光検出等の医療への応用が期待される。

2. 研究の背景

生命現象を明らかにするためには、生体内において生体分子や生体環境がどのように変化するかを、リアルタイムかつ高感度に観察することは必要不可欠であり、そのような観察技術として、蛍光イメージングは無くてはならない手法となっています。さらに、この蛍光イメージングを行うためには、標的とする生体分子（もしくは生体環境）を認識して蛍光が off から on へと変化する蛍光プローブが必要不可欠であり、このような蛍光プローブは1990年代から多くの研究者に

よって盛んに開発されてきました。これら蛍光プローブの蛍光色素骨格として、汎用されるものの一つがローダミン色素です。ローダミン色素は、高い蛍光輝度、強い光退色耐性と共に水溶性を併せ持つ蛍光色素であり、生命科学研究において汎用されてきました。一方、消光団である QSY®類に代表されるローダミン色素の N 原子にフェニル基が結合したフェニルローダミン類は、ローダミン色素と極めて類似した分子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ました (図 1)。これまでこのフェニル基を持つローダミン色素類は消光団として利用されてきましたが、詳細な消光機構に関しては調べられていませんでした。つまり、一世紀近くも知られてきたローダミン色素であるにも関わらず、依然として解き明かされていなかった性質の一つでした。本研究では、このフェニルローダミン色素の無蛍光性メカニズムの解明を行い、得られた知見を基に新たな蛍光プローブの分子設計法を確立しました。

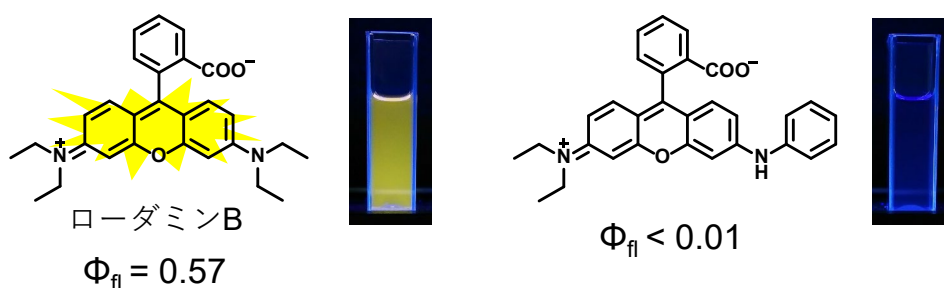


図 1. ローダミン類とフェニルローダミン類の蛍光性と無蛍光性
ローダミン蛍光色素の一つであるローダミン B (左) は強い蛍光を発するが、フェニルローダミン類 (右) は無蛍光性であった。

3. 研究の内容・成果

無蛍光性のフェニルローダミン類が、高粘性溶媒のグリセロール中にて蛍光性になることから、本色素分子の励起状態での分子の立体配座の変化が蛍光の消光において重要であると考え、分子軌道計算により精査したところ、キサテン環-N 原子間の結合が 90 度ねじれた構造が励起状態 (注 3) で最も安定な構造となり、その際に分子内電荷移動状態を形成するという計算結果が得られました (図 2)。この状態は、ねじれ型分子内電荷移動 (Twisted intramolecular charge transfer: TICT) 状態と呼ばれ、このことが色素分子の無蛍光性へと繋がっていると考えられました。

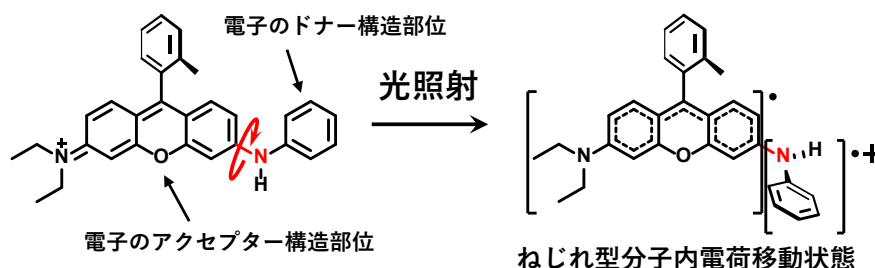


図 2. フェニルローダミン類のねじれ型分子内電荷移動(TICT)による消光メカニズムの仮説
光を色素分子に照射することで色素分子が励起状態となり、その後、左図の赤い矢印が 90 度回転し、右図のようにフェニル基部位から色素骨格部位へと電子が移動し、分子内での電荷移動状態となる。この状態をねじれ型分子内電荷移動(TICT)状態といい、無蛍光性状態となる。

そこでこの仮説を検証するため、「結合のねじれ」と「分子内電荷移動」の2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ました。まずキサントレン環-N原子間の結合の「ねじれ」の影響について検討を行うため、分子内に架橋構造を導入した誘導体を合成・評価した結果、キサントレン環-N原子間の結合を五員環構造によって架橋した誘導体において強蛍光性になることを見出しました。さらに「分子内電荷移動」の影響について調べるため、分子内電荷移動における電子のドナー構造及びアクセプター構造部位をさまざまに変化させた誘導体群を合成・評価しました。

その結果、ドナー構造の電子供与能が高いほど、またアクセプター構造部位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、蛍光消光において「分子内電荷移動」が重要であることが分かりました。これらの実験結果から、フェニル基を持つローダミン類が「ねじれ型分子内電荷移動状態」により無蛍光性になっていることを明らかにしました。

これまでの検討からフェニルローダミン類は「結合のねじれ」によって消光することが示されたことから、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を考えました。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[®]と SNAP-tag[®]に着目しました。HaloTag と SNAP-tag は、それぞれのリガンド構造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、観察したい蛋白質とこれらタグ蛋白質を融合させることで標的蛋白質の局在や発現量の変化などを解析できます。実際に、それぞれのリガンド構造を結合したローダミン類は、HaloTag および SNAP-tag と結合することで大きく蛍光が上昇し、実用的な蛍光プローブの開発に成功しました(図3A (HaloTag の例))。新たに設計した蛍光プローブを使用することにより、培養細胞における細胞膜上のタグ蛋白質の発現をリアルタイムに蛍光イメージングできるだけでなく、マウス脳における神経細胞での HaloTag 蛋白質の発現を組織透明化技術(注4)と組み合わせることで、一細胞レベルで可視化することに成功しました(図3B)。

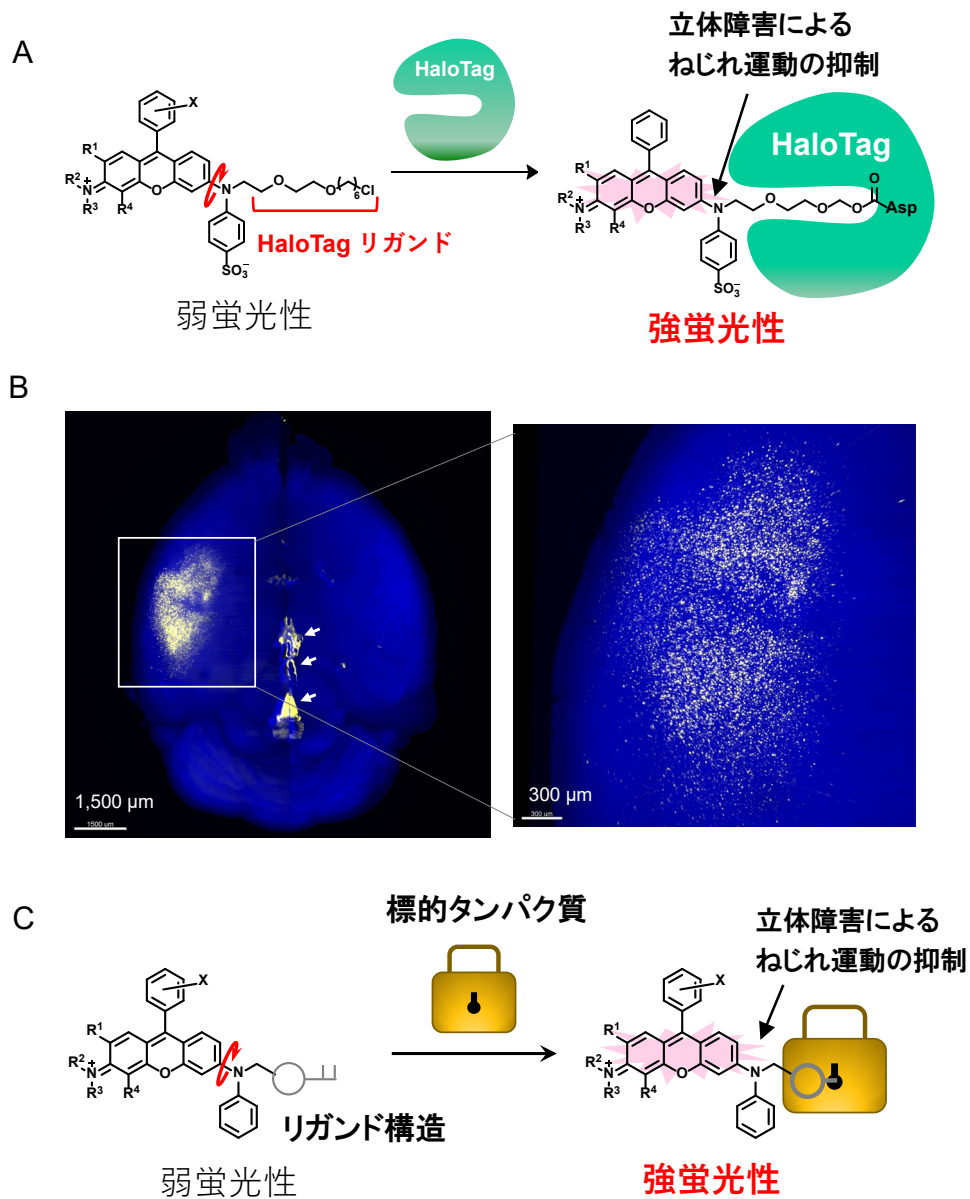


図3. 新たに開発した標的蛋白質を検出する蛍光プローブ

- (A) タグ蛋白質である HaloTag 蛋白質と結合して蛍光上昇する新たな蛍光プローブの分子設計。
- (B) 開発した HaloTag 蛍光プローブを用いて、透明化したマウスの脳組織における HaloTag 蛋白質を発現した神経細胞の 3D 蛍光イメージング。黄色：蛍光プローブ、青色：脳組織からの自家蛍光、矢印：空気によるシグナルアーチファクト。
- (C) 標的蛋白質に対して、結合することで蛍光が上昇する蛍光プローブの提案する分子設計法。

4. 今後の展開

本研究では、フェニル基を持つローダミン類の無蛍光性を「ねじれ型分子内電荷移動状態の形成」であることを見出し、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ました。今回開発した、分子内の「ねじれ」の抑制を利用した分子設計戦略は、タグ蛋白質の検出のみならず、内在性の蛋白質にも応用可能な汎用性の高い手法であり（図 3C）、がんなど疾患で高発現するタンパク質を標的とすることで、迅速な病態部位の蛍光検出など、生命科学研究のみならず、臨床医療への貢献も期待されます。

5. 論文情報

(タイトル) A general design strategy to precisely control the emission of fluorophores via a twisted intramolecular charge transfer (TICT) process

(著者名) Kenjiro Hanaoka*, Shimpei Iwaki, Kiyoshi Yagi, Takuya Myochin, Takayuki Ikeno, Hisashi Ohno, Eita Sasaki, Toru Komatsu, Tasuku Ueno, Motokazu Uchigashima, Takayasu Mikuni, Kazuki Tainaka, Shinya Tahara, Satoshi Takeuchi, Tahei Tahara, Masanobu Uchiyama, Tetsuo Nagano, Yasuteru Urano*

(雑誌) Journal of the American Chemical Society (2022)

(DOI) <https://doi.org/10.1021/jacs.2c06397>

<用語説明>

- (注1) 蛍光プローブ：標的とする生体分子との反応によって蛍光特性が変化する機能性分子であり、これを用いることで、生細胞内や生きた動物体内での生体分子の挙動を可視化することができる。現在、広く一般的に生命科学研究に用いられている。
- (注2) 分子設計：高い機能を持つ化合物をつくるなど、ある期待される性質、機能などをもつ新規の分子あるいは物質を考案、設計すること。
- (注3) 励起状態：量子力学的な系の原子・分子などのとりうる状態のうち、最もエネルギーの低い基底状態よりもエネルギーが高い状態。この状態にある原子や分子は、光などを放出してより低いエネルギー状態へ移行する。
- (注4) 組織透明化技術：組織中に光を通すような化学的処理によって、組織内部を透明化する技術であり、脳などの組織の 3 次元的な観察に利用されている。Scale 法や CUBIC などの技術がある。

※ご取材の際には、事前に下記までご一報くださいますようお願い申し上げます。

※本リリースは文部科学記者会、科学記者会、各社科学部等に送信させていただいております。

<研究内容についてのお問い合わせ先>

慶應義塾大学薬学部 創薬分析化学講座

教授 花岡 健二郎 (はなおか けんじろう)

TEL : 03-5400-2684

E-mail : khanaoka@keio.jp

本発表資料のお問い合わせ先

慶應義塾広報室 (山中)

TEL : 03-5427-1541 FAX : 03-5441-7640

Email : m-pr@adst.keio.ac.jp <https://www.keio.ac.jp/>