

新規有機化合物による生体イメージング法の開発

生体イメージング開発チーム（課題番号：147002）

研究期間：平成 26 年 7 月 29 日～平成 29 年 3 月 31 日

研究代表者：塩路幸生 研究員：林田 修、松原公紀

マイトファジー検出のための蛍光プローブの開発

細胞内小器官であるミトコンドリアは、エネルギー生産を行う細胞にとって重要な役割を担っている。近年、不良化したミトコンドリアが蓄積することにより神経変性疾患のパーキンソン病やアルツハイマー病が発症することが分かっている¹⁾。そのことからミトコンドリアの形態変化を診ることは細胞動態を知る上で重要

であると言える。そこでミトコンドリア異常の際に起こるマイトファジーと呼ばれる現象に注目した。マイトファジーは、酸化ストレスなどの要因によって不良化したミトコンドリアを除去するシステムで、まず、ファゴフォアとよばれる隔離膜が形成され、不良化したミトコンドリアを隔離し、次にリソソームと融合し、リソソーム内の消化酵素によって分解されるというものである (Figure 1)。

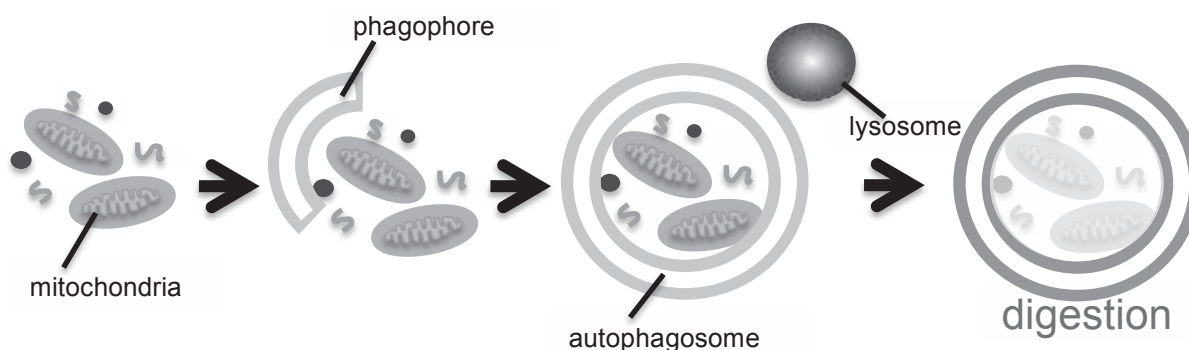


Figure 1. Schematic illustration of mitophagy process.

近年マイトファジーの研究は盛んに行われており、2014年Leeらによって報告された化合物では、ミトコンドリア (pH8.0) からマイトファジーによってリソソーム (pH4.5-5.0) に取り込まれる際のpH変化を利用してマイトファジーを検出出来たことを報告している。しかし、これには細胞内にエンドソーム (pH4.0) やゴルジ体 (pH6.5) など弱酸性を示す器官は他にも存在しているということ、またミトコンドリアは常にプロトンを生産する器官であり、そのプロトンの影響を考慮する必要があるなどの問題点がある。

そこで我々は、リソソーム内に存在する酵素に活性をもつペプチド部位を基本骨格とすることでマイトファジー検出の正確性を向上させようと考え1を設計した

(Figure 2)。1は、ペプチド部位のN末端に消光基としてDABCYL、C末端に蛍光基としてナフトリミド誘導体を結合している。マイトファジー検出機構は、

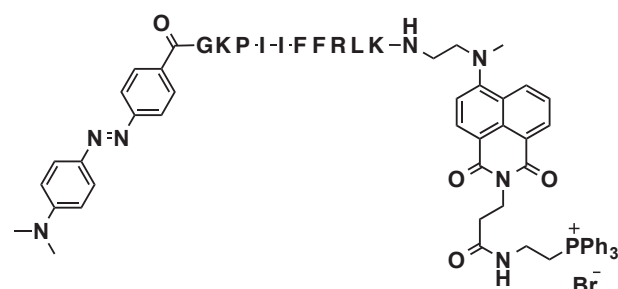


Figure 2. Molecular design of 1.

FRET効果を利用して消光状態からリソソーム内に内在化しているカテプシンDによってペプチド鎖が切断される³⁾ ことによりFRET効果が解消され蛍光強度が増加することで検出する。本研究では、**1**を合成し細胞導入によりマイトファジーを検出することを目的とした。

・光学特性

紫外可視吸収及び蛍光スペクトルの測定を行った結果から**1**は蛍光強度に大きな差が見られたことからFRETにより消光していることが考えられる。

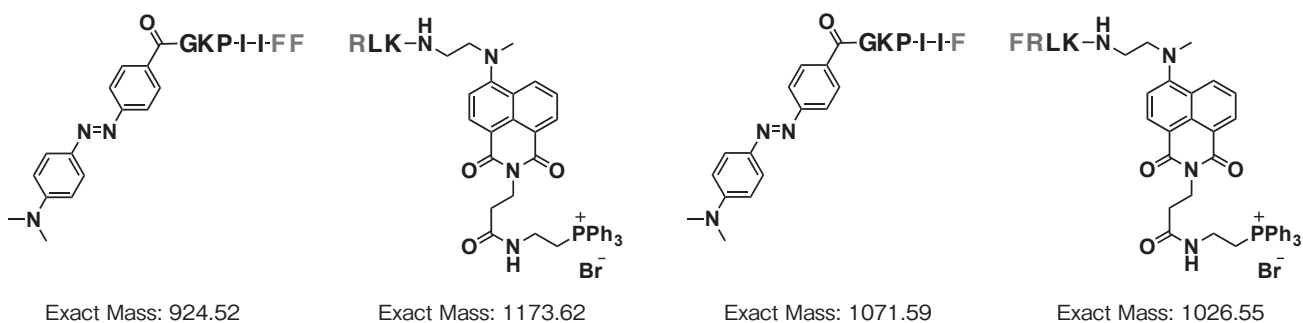
・酵素活性の測定

1にカテプシンD添加後の蛍光スペクトルの経時変化を測定した。この結果からカテプシンDによってペプチド鎖が切断されることによりFRETが解消され約4倍

の蛍光強度の増大を確認できた。この結果から予想通り**1**はFRET効果を有する化合物であることが明らかとなった。

・切断箇所の確認

経時変化を測定した試料をHPLCにて分取し、質量分析によってペプチド鎖の切断箇所の確認を行った。HPLCにおいてカテプシンDでは4本のピークを検出したため、文献で報告されていた切断箇所以外でも切断が起こっていることが分かった。HPLCにて分取後MLDI-TOF MSにて測定を行ったところ、フェニルアラニンとアルギニンの間が切断されていることが分かった。カテプシンDはゆるやかな基質特異性を持つ酵素であることが原因と考えられる。



・細胞導入実験

ヒト肝がん由来であるHepG2細胞を用いて**1**とミトコンドリア染色試薬であるMitoRedとの二重染色実験を行った。**1** 5 μ MとMitoRed 25nMを含む1.5%DMSO溶液を調整し、37 $^{\circ}$ Cの条件下で30分間染色後、蛍光顕微鏡による観察を行った。重ね合わせ画像より、FRETにより消光状態であるため弱い蛍光であるが**1**の緑色蛍光部位およびMitoRedの赤色蛍光部位が一致していることから、ミトコンドリアに局在していることが確認できた。

次にミトコンドリアへの局在を確認できたためミトコンドリア脱分極剤である FCCP (Carbonyl cyanide-*p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone) を添加することでミトコンドリアからリソソームへの放出を誘導し、経時変化を観察した。リソソーム染色試薬であるLysotracker[®]Red

との二重染色によって**1**の蛍光がリソソームにあることからカテプシンDを検出することができた。

・酵素選択性

細胞蛍光画像よりリソソーム以外の部分での蛍光を観察したことからその他の酵素による切断が起こっているのではないかと考え、ペプチド鎖の酵素選択性を調査した。HBSS(Hank's Balanced Salt Solution) 中のHepG2細胞をホモジナイザーですり潰し、遠心分離機にて細胞片を沈殿させ、上清を取り出し酵素抽出液を作成した(Figure 3)。

作成した酵素抽出液を用いてカテプシンDの至適pHであるpH4.0の緩衝液と細胞質中のpH7.4の緩衝液中で測定を行った。その結果pH4.0では蛍光強度の増大が確認され、pH7.4では蛍光強度の変化は見られなかった。この結果から、細胞質中での切断は起こらずリソソーム

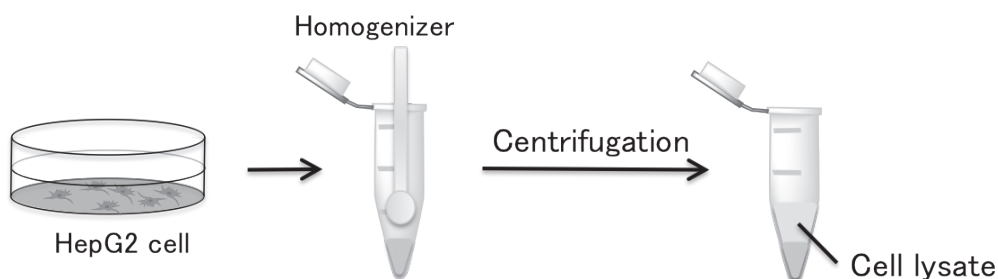


Figure 3. Schematic procedures of lysate solution preparation.

内でのみ起こっていることが明らかとなった。Fengkai 等によって一度リソソームに局在した蛍光色素が漏れ出す現象が報告されており、この結果から FCCP により脱分極を誘導させた実験の蛍光画像で、細胞質でも蛍光が観られていた原因は、一度リソソームに局在した蛍光色素が放出されているためではないかと考察している。

ミトコンドリア膜タンパク質と結合する置換基の合成

生命体は多くの細胞によって構成され、その細胞内にはミトコンドリアやリソソームなど様々な微小器官が特有の機能を果たしている。その中でもミトコンドリアは主に酸化リン酸化によるエネルギー生産を担っており、その過程で生成される活性酸素種 (ROS : Reactive Oxygen Species) によってアポトーシスを促し、がんや脳梗塞といった病気の原因となる。このようにミトコンドリアの生命発現は生命活動に大きく関わっており、重要な微小器官の一つであるといえる。ミトコンドリアは内外膜間からマトリックス内に H^+ を送り込むことでエネルギー生産を行うため、ミトコンドリア膜間に電位差が生じている。

このようなミトコンドリアの研究のために用いられ

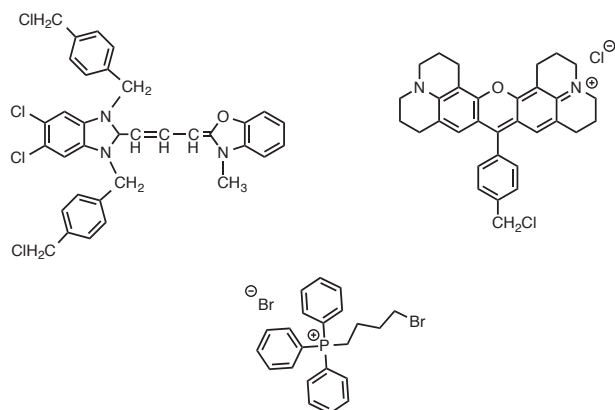


Figure 4. Molecular structures of Mitotracker® Green (left), Mitotracker® Red (right) and bromobutyltriphenylphosphonium bromide (center).

ジベンゾナフチリジン誘導体の合成、蛍光特性及び核酸親和性

窒素を含む複素環化合物である 1,6-ナフチリジンや 1,8-ナフチリジンを母体骨格とするナフチリジン誘導体は、不整脈治療薬や抗鎮痛剤、癌など人間の病気治療で広範囲の生理活性を示すことが知られている。また、分子認識²⁾や蛍光検出³⁾における発光材料としても用いられている。

る染色試薬として Mitotracker シリーズがある (Figure 4)。これらの試薬は 4 級アミンを分子内に持つことでミトコンドリアの膜間に生じる電位差を利用して静電的相互作用により局在する。側鎖にクロロメチル基を導入することでミトコンドリア膜タンパク質に存在するシステインのメルカプト基と共有結合することが報告されている^{2,3)}。タンパク質との共有結合があることで、膜電位差の解消 (脱分極) が生じてもミトコンドリア内に局在化することができる。その他にもミトコンドリア内のタンパク質と結合する化合物としてプロモブチルトリフェニルホスホニウムブロミド (Figure 4) が Murphy らによって報告されている⁴⁾。

我々は、トリフェニルホスフィンの一つのフェニル基に 4-カルボキシル基を導入した新しいミトコンドリア局在置換基を設計した。その置換基は様々な蛍光体に脱水縮合によって結合することができる。今回、蛍光団として低い環境応答性かつ高発光性蛍光色素として知られる BODIPY を用い、ミトコンドリア選択的局在かつ膜タンパク質との結合する官能基を一つの部位に集約させたプロモプロピルトリフェニルホスホニウムブロミドを導入した化合物 **2** (Figure 5) を合成し、細胞導入を行った後、ミトコンドリアの脱分極を行い、ミトコンドリア内のタンパク質との結合能を評価した。

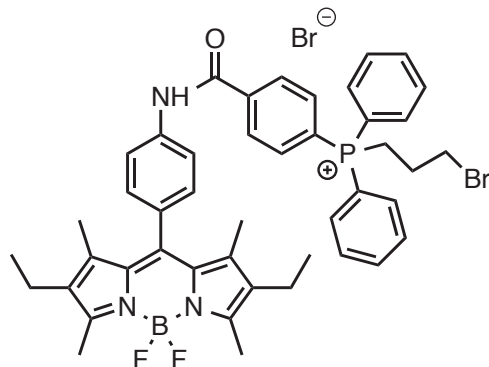
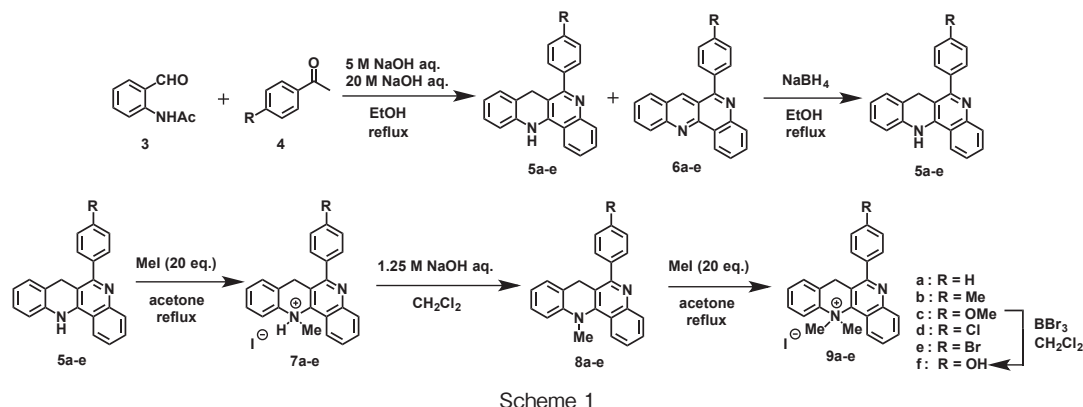


Figure 5. Molecular design of **2**

我々は、2-アセチルアミノベンズアルデヒド **3** とアセトフェノン誘導体 **4** から one-pot 合成によりナフチリジン誘導体を合成した。ヨードメタンを用いて N-メチル化することにより、窒素上にメチルが一つまたは二つ付加したモノメチル体 **8**、ジメチル体 **9** を合成した。

本研究ではナフチリジン誘導体 (**8, 9**) と DNA 及び RNA 複合体の結合様式を明らかにすることを目的とする。今回は **9a**-DNA 複合体の結合様式を明らかにすることを試みた。



合成した **9a-f** を用いて紫外可視・吸収、蛍光スペクトルの測定を行ったところ、置換基による影響を受けない吸収、蛍光であることがわかった。また **9a-e** を用いて蛍光滴定実験を行ったところ、plasmid DNA では最大 13 倍の蛍光強度の増大、*r*RNA では最大 4 倍の蛍光強

度の増大が観測され、**9a-e** は DNA 及び RNA と相互作用を示すことがわかった (Figure 6)。今後、**9** と DNA 及び RNA 複合体の結合様式について明らかにする予定である。

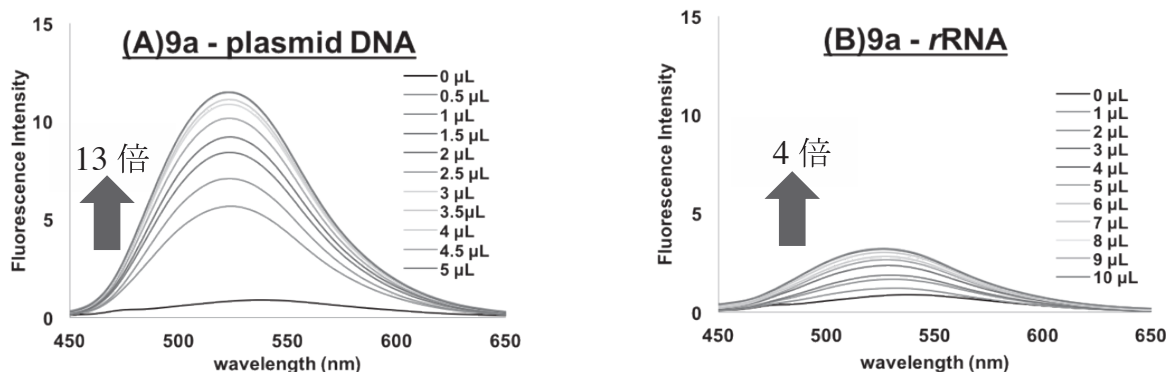


Figure 6. Fluorescence spectra of **9a** (1 μM) upon addition of (A) plasmid DNA (1.5 mg / mL), (B) *r*RNA (3.2 mg / mL) in Tris HCl Buffer (0.01 M, pH7.6). [plasmid DNA] = 0-5.0 mL. [*r*RNA] = 0-10.0 mL. **9a** : λ_{ex} = 410 nm (plasmid DNA, *r*RNA).

可視光応答性分子の創製及び光特性

真核細胞には核、小胞体、ミトコンドリアといった様々な微小器官が存在し、それらは脂質膜によって細胞質から隔てられ、その内部でそれぞれの機能を果たしている。しかし、細胞環境を乱すことによる細胞への影響は明らかとなっていない。

近年、光応答性分子として光照射による可逆的な構造異性化を生じるフォトクロミック化合物であるアゾベンゼンに着目し、脂質二重膜に組み込ませたアゾベンゼンの光異性化により引き起こされた膜構造の形態変化の例が数多く報告されている¹⁻³⁾。そこで当研究室の尾崎は、中野らにより報告された可視光領域で光異性化にตอบสนองし、力学的運動を生み出し得る 4-[di(biphenyl-4-yl)amino]azobenzene (DBAB) を光応答性部位として利用し、DBT (DBAB-BODIPY-TPP; Figure 7) を設計した。DBT は、細胞内挙動を可視化するための蛍光団 borondipyrromethene (BODIPY)

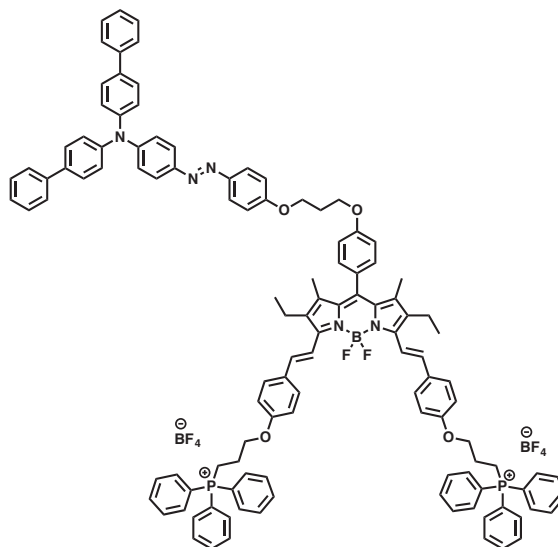


Figure 7. Molecular design of DBT

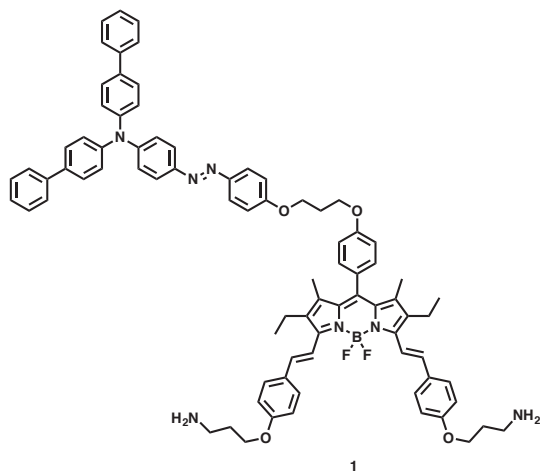


Figure 8. Molecular structure of DBA

と、分子全体の水溶性及び、細胞内局在能の向上を意図して triphenylphosphonium salt (TPP) を同一分子内に有している。DBT を細胞に導入し、光異性化によって生じる生命活動への影響を観察したところ、*trans*-DBT がリソソーム膜に局在し、照射によって生成した *cis*-DBT によって膜構造が不安定になり、その結果、細胞質へ内包液が放出されることによって誘発された細胞死である、ネクローシスによる細胞死が引き起こされたと報告した。しかしながら、このような膜構造におけるアゾベンゼンの光異性化が及ぼす形態変化の条件や規則性は明らかとなっていない。

また、細胞形質膜へ光応答性分子を局在させ、光異性化を行うと細胞にどのような影響を及ぼすかは興味を持たれるところである。そこで私は、光応答性部位として DBAB、細胞内挙動を可視化するための蛍光部位として BODIPY、細胞膜への局在能を指向してアミノプロピル基を同一分子内に有する光応答性分子 DBA (DBAB-BODIPY-Aminopropyl; Figure 8) を設計した。DBA のアミノプロピル基はオルニチン (Figure 9) の側鎖に類似している。オルニチンは膜破壊を誘発する抗菌性環状ペプチドであるグラミシジン S の膜局在部位となっている。グラミシジン S はオルニチンの側鎖のアミノ基と脂質の親水部分との相互作用により、細胞形質膜に結合でき、膜破壊を引き起こすと考えられている。すなわち化合物 1 は、細胞膜との親和性がある化合物として期待できる。本研究では、化合物 DBA を用いて、光特性及び脂質二重膜との親和性を調査し、脂質膜に取り込まれた化合物 DBA の光異性化によって生じた力学的運動に

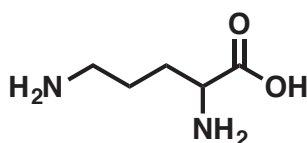


Figure 9. Molecular structure of Ornithine

よる脂質二重膜の形態変化への影響を明らかにする。

研究業績

1. Synthesis of a cysteine-linked cyclophane dimer having two rhodamine moieties and its reduction-responsive degradation as studied by fluorescence spectroscopy, O. Hayashida, K. Nishino, S. Kusano, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, Vol. 87, No. 3-4, 267-274 (2017).
2. Development of Tetraphenylethylene-appended tetraazacyclophanes: the evaluation of aggregation-induced emission property and the application for biomolecular sensing, S. Kusano and O. Hayashida, *Chem. Lett.*, Vol. 45, No. 9, 1084-1086 (2016).
3. Synthesis of a water-soluble macrocyclic anthracenophane and its size-selective molecular Recognition, K. Nakamura, S. Kusano, and O. Hayashida, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, Vol. 85, No. 1, 121-126 (2016).
4. Synthesis of water-soluble cyclophane hexamers having a triphenylene core and their enhanced guest-binding behavior, O. Hayashida, T. Matsuo, K. Nakamura, and S. Kusano, *J. Org. Chem.*, Vol. 81, No. 10, 196-4201 (2016).
5. Synthesis and effect of linker length on guest-binding affinity of water-soluble tetraazacyclophane dimers, O. Hayashida, K. Matsushita, and S. Kusano, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, Vol. 84, No. 3, 237-243 (2016).
6. Biotinylated cyclophane: Synthesis, cyclophane-avidin conjugates, and their enhanced guest-binding affinity, O. Hayashida, M. Kojima, and S. Kusano, *J. Org. Chem.*, Vol. 80, No. 19, 9722 (2015).
7. Synthesis of coumarin-appended cyclophanes and evaluation of their complexation with myoglobin, O. Hayashida, Y. Harada, and M. Kojima, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, Vol. 83, No. 1-2, 111-117 (2015).
8. Entrapment and release of guest molecules by reduction-responsive cyclophane dimers based on disulfide linkage, O. Hayashida and K. Kojima, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, Vol. 85, No. 5, 729-735 (2015).
9. Synthesis and guest-binding behavior of water-soluble cyclophanes bearing PEG residues, O. Hayashida, Y. Nakamura, and T. Sato, *Adv. Chem. Eng. Sci.*, Vol. 4, No. 4, 409-416 (2014).
10. Synthesis of a rhodamine-appended cyclophane as a fluorescence host in water, O. Hayashida and Y. Kaku, *Adv. Chem. Eng. Sci.*, Vol. 4, No. 4, 401-408

- (2014).
- Degradation properties and pH-responsive guest-release of cyclophanes having four ester side chains with terminal choline residues, O. Hayashida and D. Sato, *Chem. Lett.*, Vol. 43, No. 3, 322-324 (2014).
 - 古賀裕二・山崎裕美子・吉田奈々恵・鳥居香里・松本泰昌・松原公紀
ピリジンをもつ赤色燐光性イリジウムおよび白金錯体の合成と発光挙動 福岡大学理学集報, 45 (1), 29-41 (2015).
 - 松原公紀
かさ高いN-ヘテロ環状カルベンをもつニッケル錯体触媒の開発とクロスカップリング反応への応用有機合成化学協会誌, 72(10), 1110-1119 (2014).
 - 松原公紀・山本 瞳・長尾慎哉・宮崎智史・上野景太・古賀裕二
福岡大学理学集報, 42(2), 133-141 (2012).
 - Dinuclear Systems in the Efficient Nickel-Catalyzed Kumada-Tamao-Corriu Cross Coupling of Aryl Halides. K. Matsubara, H. Yamamoto, S. Miyazaki, T. Inatomi, K. Nonaka, Y. Koga, Y. Yamada, L. F. Veiros, K. Kirchner. *Organometallics*, 36, 255-265 (2017).
 - Monomeric Three-coordinate N-Heterocyclic Carbene Nickel(I) Complexes: Synthesis, Structures, and Catalytic Applications in Cross-Coupling Reactions. K. Matsubara, Y. Fukahori, T. Inatomi, S. Tazaki, Y. Yamada, Y. Koga, S. Kanegawa, T. Nakamura. *Organometallics*, 35, 3281-3287 (2016).
 - Aluminum Complex Initiated Copolymerization of Lactones and DL-Lactide to Form Crystalline Gradient Block Copolymers Containing Stereoblock Lactyl Chains. K. Matsubara, K. Eda, Y. Ikutake, M. Dan, N. Tanizaki, Y. Koga, M. Yasuniwa. *J. Polym. Sci. A: Polym. Chem.* vol. 54, 2536-2544 (2016).
 - Bimetallic Cu(I) Complex with a Pyridine-Bridged Bis(1,2,3-triazole-5-ylidene) Ligand. H. Iwasaki, Y. Teshima, Y. Yamada, R. Ishikawa, Y. Koga, K. Matsubara. *Dalton Transactions*, 45, 5713-5719 (2016).
 - Isolation and Structures of 1,2,3-Triazole-Derived Mesoionic Biscarbenes with Bulky Aromatic Groups. H. Iwasaki, Y. Yamada, R. Ishikawa, Y. Koga, K. Matsubara, *Eur. J. Org. Chem.* 1651-1654 (2016).
 - Synthesis and Structure of Homoleptic Iron Complex Bearing Pincer-Type 1,2,3-Triazol-5-ylidene. H. Iwasaki, Y. Koga, K. Matsubara, *Org. Chem. Curr. Res.* S6, 1-5 (2016).
 - Live Cell Imaging of Mitochondrial Autophagy with a Novel Fluorescent Small Molecule Hidefumi Iwashita, Satoru Torii, Noriyoshi Nagahora, Munetaka Ishiyama, Kosei Shioji, Kazumi Sasamoto, Shigeomi Shimizu, and Kentaro Okuma. *ACS Chem. Biol.*, 2017, 12 (10), pp 2546-2551.
 - One-pot synthesis of dibenzo[b,h][1,6]naphthyridines from 2-acetylaminobenzaldehyde: application to a fluorescent DNA-binding compound. Kentaro Okuma*, Tomohiro Koga, Saori Ozaki, Yutaro Suzuki, Kenta Horigami, Noriyoshi Nagahora, Kosei Shioji, Masatora Fukuda and Masanobu Deshmaru. *Chem. Commun.*, 2014, 50, 15525-15528.
 - Stable 1H-Benzo[c]thio- and 1H-Benzo[c]selenophen-2-ium Tetrafluoroborates: Insight into Electronic Structures, Electrochemical Behavior, and Reactivity. Noriyoshi Nagahora*, Ikue Takemoto, Motomi Fujii, Kosei Shioji, and Kentaro Okuma. *Org. Lett.*, 2017, 19 (8), pp 2110-2113.
 - Comparison of the Reactivity between Linear and Cyclic Spin Traps containing Diphenylphosphinoyl moiety. Kosei Shioji*, Hidefumi Iwashita, Noriyoshi Nagahora and Kentaro Okuma. *Fukuoka University Science Reports* 47(1)7~14 (2017).
 - Synthesis and Properties of Fluorescence Spin Traps Containing Phosphinoyl Moiety. Kosei Shioji, Hidefumi Iwashita, Noriyoshi Nagahora and Kentaro Okuma. *Fukuoka University Science Reports* 47(2), 99-103, 2017-09 (2017).
 - Tandem Reaction of Arynes with Tertiary Amines and Aldehydes: Formation of 9- and 10-Membered Dibenzo[1,5]oxaza Heterocycles. Kentaro Okuma, Hiroaki Kinoshita, Noriyoshi Nagahora, Kosei Shioji. *Eur. J. Org. Chem.* 2016, 2264-2267.
 - Synthesis of 2,3-Benzodiazepines and 2,3-Benzodiazepin-4-ones from Arynes and β -Diketones Okuma Kentaro, Tanabe Yukiko, Nagahora Noriyoshi, Shioji Kosei. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 2015, 88, 1064-1073.