

## GFP 蛍光発色団アナログ (DAIN) の合成と蛍光評価

藤坂 朱紀\*

**抄録** 当研究室では、緑色蛍光タンパク質 (GFP) の発色団をモデルとした新規蛍光分子 (DAIN) の開発研究を行っている。これまで独自の合成法によって様々な DAIN 誘導体の合成に成功した。得られた DAIN 類の蛍光特性を評価し、この特性を活かして生体分子の動きを探るセンサー分子の開発へと展開した。本稿では、有機合成やケミカルバイオロジー、機器分析化学の分野で行われる研究に親しむことを目的に、私たちの研究を紹介した。そのため、化合物の表記法や反応機構の書き方、その他用語の解説など、有機化学の基本的知識の補填となるよう説明を加えた。

**キーワード** 有機合成, ケミカルバイオロジー, 機器分析化学, 蛍光分子

## 1. はじめに

薬学部 有機化学講座では有機合成法による新しい蛍光分子の設計と合成、また機器分析による蛍光特性の評価を行っている。私たちの研究対象は蛍光分子などの「有機化合物」であり、有機化合物とは炭素と水素を含む化合物のことをいう。これら有機化合物の構造式の表記方法にはルールがあり、例としてアミノ酸の一種であるチロシンの構造式を示す (図 1 左)。それぞれの原子 (C: 炭素, H: 水素など) を結ぶ直線は共有結合を表し、2 重線は 2 本の結合で結ばれていることを示す。炭素 C はすべて、また炭素に結合している水素 H は誤解がなければ省略することができ、ほとんどの場合、省略した表記で示される (図 1 右)。

つぎに「有機合成」とは化学反応を駆使して目的の有機化合物を作ること、合成研究では反応機構の解明が必要である。反応機構とは化合物の結合がどのような順番で切れ、どの結合が新しくできるのかを表現するもので、例として塩化アセチルと水の反応機構を示す (図 2)。さきほど直線は共有結合を示すと説明したが、これ

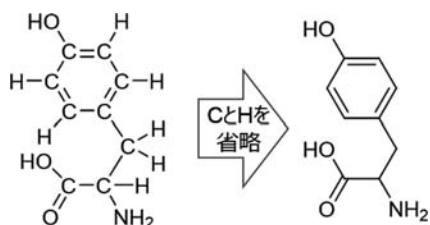


図 1 構造式の描き方 —アミノ酸チロシンの構造—

は 2 つの電子によって形成されている。化学反応はこの電子の授受によって起こり、その動きを矢印で示している。電子を黒い 2 つの丸で表すと、水分子の OH (丸棒) は電子を持って H との結合を切り、塩化アセチルの二重結合している炭素 C と新しい結合を作りに行く。その代わりに塩素 Cl (四角棒) は電子を持って炭素 C から離れることで、結果として酢酸ができる。また電子を持った Cl が電子を奪われた水の H と新しい結合を作り塩化水素となる。この反応機構の理解は薬学部生も置くことが多いため詳細な説明は省くが、このような反応機構を考えることは、反応条件の最適化や新反応の開発、新たな知見の獲得につながる。

緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein, 以下 GFP) はオワンクラゲより単離された分子量 27 kDa の蛍光タンパク質であり、医学・生命科学研究においては、生命現象の可視化ツールとして必要不可欠な存在である<sup>1)</sup>。図 3 a に示した GFP の立体構造の模式図は、太さが増える長い糸がコイル状に並んでいるように見え

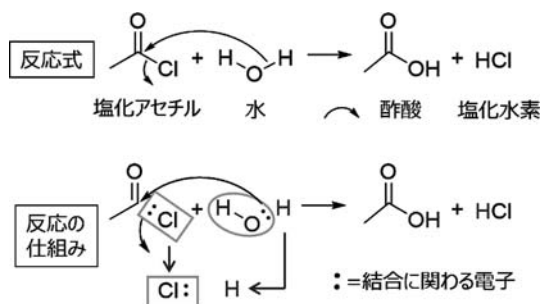


図 2 反応機構の書き方 —塩化アセチルと水の反応—

\*薬学部有機化学講座

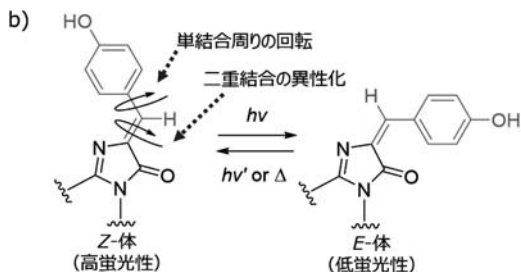
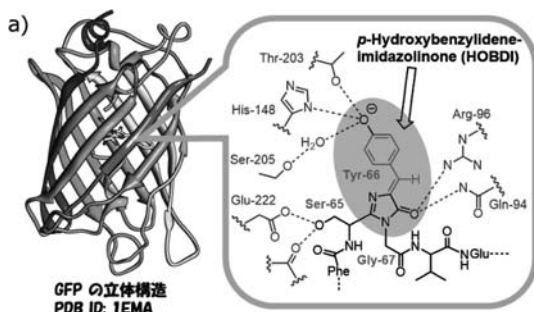


図3 a) GFP と HOBDI の構造, b) HOBDI の異性化

るだろう。この糸はタンパク質を構成するアミノ酸が連なったもので、それらが複雑に折れ曲がって特定の立体構造を取っていると想像してほしい。省略せずに描くと、図1に示したチロシンのような構造式がびっしり並んでいるわけである。

GFP が注目された理由の一つに、その発光過程には基質や補因子を必要としないという特徴がある。ホタルに代表される多くの生物の発光には、酵素（ルシフェラーゼ）、基質、補因子のすべてが揃って初めて起こる。しかし、GFP は単独で、光照射だけで蛍光を発生し、発色団（分子やタンパク質の中の、色を決める部分）形成も単独で自発的に進む。ここで蛍光現象について簡単に触れておく。蛍光とは、GFP の発色団が光を吸収してエネルギー準位の高い励起状態へ遷移した後、元の基底状態に戻る際に発せられる吸収した光よりも波長の長い光のことを指す（図4）。野生型 GFP は、395 nm 付近の光（紫外線）を吸収して 508 nm の緑色の蛍光を示すことが知られている。蛍光発色団がどの波長の光で励起され、どんな波長の蛍光が発せられるのかという情報は、その蛍光分子をどのように利用できるか考える際に重要である。また、蛍光分子の構造をどのように変換すれば、どのような蛍光色を出せるのかは、有機合成的にも魅力的な研究課題である。

このような考えから、近年では GFP 発色団である *p*-hydroxybenzylideneimidazolinone (HOBDI) 構造（図3 a

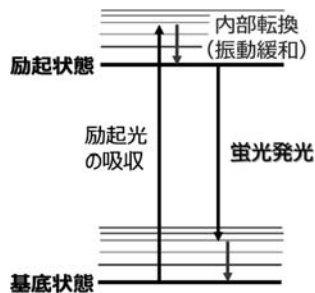


図4 蛍光現象のメカニズム

楕円の影部分) をモデルにした蛍光分子が数多く報告されている<sup>2)</sup>。当講座でも、独自の発想に基づく新規蛍光分子 [(diarylmethylene) imidazolinone (DAIN)] の開発を行ったため、これまでに得られた結果と今後の展望について概説する。

## 2. DAIN 類の設計と合成

### 2.1 DAIN 類の設計

GFP 発色団である HOBDI 構造（図3 a）は、GFP の立体構造の中心あたりに位置し、周辺にあるアミノ酸残基と水素結合（破線）している。このため、HOBDI 構造中のベンジリデン基（HOBDI 構造の上部、灰色部位）は *Z*-配置に固定されており、これが蛍光を発生するために重要である。それは HOBDI 構造をタンパク質の立体構造から取り出した場合、ベンジリデン基は光照射で *Z*-配置から *E*-配置に異性化し、*Z*-体において高い蛍光を示すのに対して、*E*-体においては蛍光能が著しく減弱するためである（図3 b）。さらに、HOBDI 構造単体の場合、溶液状態では蛍光を示さないのに対して、結晶状態あるいは凍結状態において蛍光を示す、あるいは分子会合により蛍光を示すという特性がある。これは光の照射により励起状態へ遷移したとき、溶液状態ではベンジリデン構造部分の回転（巻矢印）によりエネルギーを消費して、蛍光を発生することなく基底状態へと戻っている。これに対し、結晶や凍結状態あるいは会合状態においては、ベンジリデン構造のコンホメーションが固定され、回転できなくなるため蛍光を発生すると考えられている。

このような背景から、ベンジリデン基を蛍光能のある *Z*-配置に固定するという点に着目した研究が報告されている<sup>3,4)</sup>、どの化合物もベンジリデン構造を持つ点では共通していた。これに対して当講座の研究では、ベンジリデン基をジアリールメチレン基（二重結合の上に2つの Ar 基を持つ構造）に置き換え DAIN を設計した（図5）。これによって幾何異性体が存在しなくなるた



図5 DAIN 類の構造

め、*E*-体への異性化による蛍光の減弱はなくなる。その一方で、ベンジリデン基と同様にジアリールメチレン基の回転による蛍光能の消失は起こりえると考えられた。すなわち、DAIN 類はジアリールメチレン部位のコホメーション固定の有無をスイッチとする蛍光プローブになると考えた<sup>5,6)</sup>。

ここまでの流れで、HOBDI 構造をタンパク質から取り出すのではなく、タンパク質ごと新しくつくれば良いと考える人はいただろうか。その通りで、実際に遺伝子工学により変異型 GFP は数多く研究されている。しかし有機合成的にタンパク質のような巨大分子は研究対象に向かない。つまり、DIY 工具で一軒家を建てるのは大変な労力が必要で、もっと大型の機械を使った方がいい一方で、洒落た家具を作るなら DIY 工具で十分である。HOBDI 構造は GFP の 100 分の 1 程度の分子量であるため、有機合成の研究対象に相応しいのである。

## 2.2 DAIN 類の合成

はじめ、ジフェニルメチレンイミダゾリノン体 (DAIN の Ar がフェニル (Ph) 基のとき) の構築は、ベンジリデンイミダゾリノン類の合成と同様の反応にて可能と思われた。しかし実際は、イミダゾリノンとベンズアルデヒドとの反応でベンジリデンイミダゾリノン類が合成できるのに対し (図 6 a)、ベンズアルデヒドの代わりにベンゾフェノンを用いた反応からは、ジフェニルメチレン体を得ることはできなかった (図 6 b)。

そして現在、DAIN 類の合成に用いられる反応は、当講座の先生が以前行っていた別研究の副反応として見出された反応だった (図 6 c)。当初の目的はデヒドロアミノ酸体を得ることだったが、イミノ酢酸エステル誘導体とチオイミデートを反応させて得られた化合物は、予想とは全く異なるものであった。そこで様々な構造解析を行い、最終的には X 線結晶解析によって DAIN 構造であると確認された。このような思ってもみなかった発見は、有機合成研究の醍醐味である。

得られた構造をもとに、反応機構は図 7 のように考えられた。さらに本反応を DAIN 類合成に応用するにあたっては、反応条件の最適化を行った結果、酢酸程度の

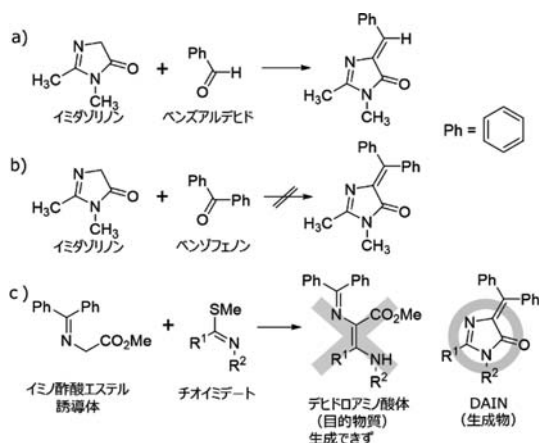


図6 DAIN 合成の検討

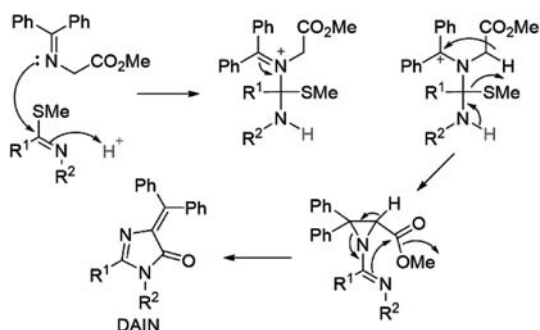


図7 DAIN 生成の反応機構

弱酸の添加によって、より反応が円滑に進行することがわかった。ここで注目してほしいのが、反応機構の最初の電子の動きだ。チオイミデートの窒素にプロトン ( $H^+$ ) が結合する過程に、酸 ( $H^+$  を放出する化合物) の添加が有用であることが予想できると思う。つまり、考えられる反応機構から酸の必要性を予想し、どの程度の酸がいいか、どれくらいの量がいいかを細かく検討し、最終的な条件を決定したのである。その結果、図 8 のように様々な DAIN 類を合成することに成功した。

## 3. DAIN 類の蛍光特性

得られた DAIN 類の蛍光特性を評価したところ、液体状態ではほとんど蛍光を示さず、固体状態や凍結状態で多くの DAIN で蛍光が観察された (図 8)<sup>6)</sup>。これにより、予想通り DAIN 構造のジアリールメチレン部のコホメーションを固定するかしないかで、蛍光のスイッチングが可能であることが明らかとなった。さらに蛍光を撮影した写真を比較してみると、DAIN のイミダゾリノン環に接合する構造の違いによって、495 nm~540

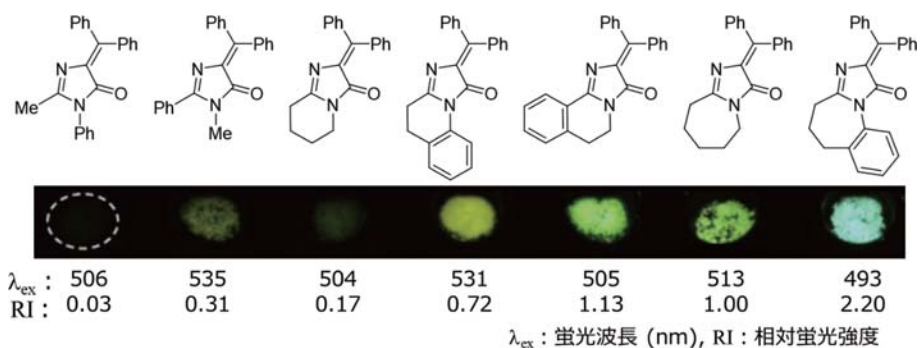


図 8 DAIN 類の構造と蛍光特性 (粉末状態)

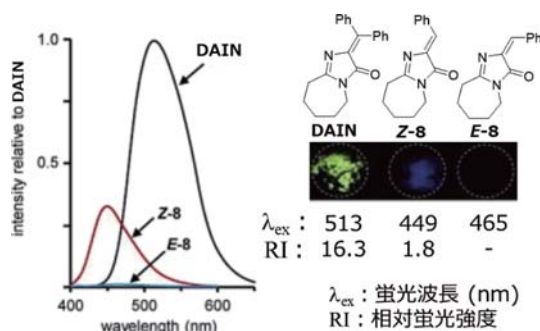


図 9 DAIN と天然型 BDI 構造との蛍光特性の比較

nm の蛍光 (目視の色として、シアン～黄色) が観察された。

次に天然型のベンジリデンイミダゾリノン構造 (BDI 構造) との蛍光特性の比較を行った (図 9)<sup>5)</sup>。その結果、BDI を DAIN にすることで粉末蛍光における蛍光波長の長波長シフトと蛍光強度の増加が観測された。また、*E*-BDI 構造では粉末状態でもほとんど無蛍光であったことから、*Z*-体と *E*-体の光異性化による構造変化のない DAIN 構造の有用性が確認できた。

これまでの結果から、DAIN 類は分子運動の制御、つまりコンホメーションの固定による蛍光スイッチ機能を有することが明らかとなった。そこで現在、この機能を利用した蛍光プローブへの展開について様々な検討を進めている。その一つとして遺伝子配列を認識する DAIN の開発について紹介する。側鎖にアンモニウム ( $\text{N}^+\text{HMe}_2$ ) 基を持つ DAIN X は二重鎖 DNA と buffer 中で混ぜ合わせると蛍光を発し、時間経過とともに強度の増加を示した (図 10 a)<sup>5)</sup>。対照実験として DAIN X のみや DNA のみでも測定したが、蛍光は見られなかった。よって DAIN X は二重鎖 DNA 共存下でのみ蛍光を発することが分かったが、これは配列非特異的効果 (遺伝

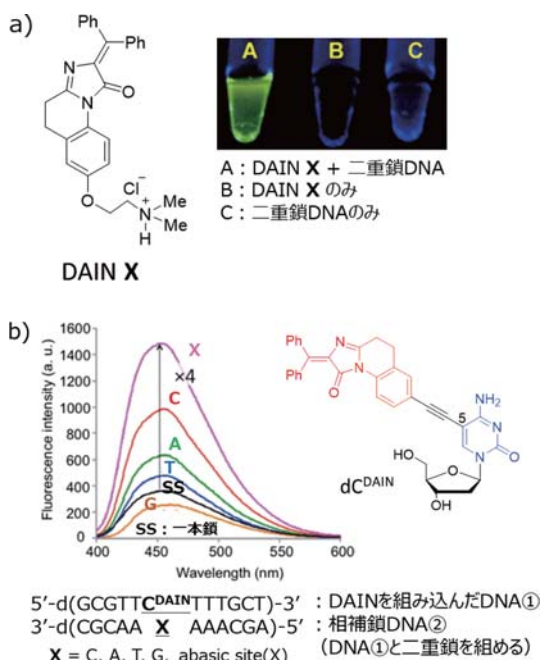


図 10 a) 二重鎖 DNA 共存下の DAIN X の蛍光特性、  
b) DAIN を組み込んだ DNA の二重鎖形成時の蛍光特性。

子配列が何であれ同じような結果) だった。このため、次に配列依存的な蛍光のスイッチング (特定の遺伝子配列のときだけ蛍光を示す効果) を目指し、シトシン (青) 5 位にアセチレン鎖を介して DAIN (赤) を導入した  $\text{dC}^{\text{DAIN}}$  を短い DNA 配列①の中に組み込んだ。相補鎖 DNA②と二重鎖を形成したときの蛍光を測定したところ、DNA②中の塩基の種類 (X) が abasic site つまり塩基が存在しない場合が最も強い蛍光を示し、反対にグアニン塩基 (G) のときに最も蛍光強度が低下した (図 10 b)<sup>7)</sup>。このように、DAIN を組み込んだ DNA は、

相補鎖の遺伝子配列に応じて蛍光強度が増減することを見出した。しかし、いまだ特定の配列の遺伝子にだけ蛍光を示す DAIN の開発には至っておらず、今後も検討していく予定である。

#### 4. おわりに

当研究室で開発してきた DAIN 類の特性は、新しい蛍光センサーやイメージング分子への応用が期待される。今回は DNA 配列を認識するプローブへの応用を紹介したが、その他にも環境依存的な蛍光挙動を示す DAIN の開発や細胞膜の流動性を検知する粘性プローブへの応用、また DAIN 合成法のさらなる改良も検討している<sup>8-10)</sup>。

本稿は有機化学の知識がない学生に向けて、私たちの研究を紹介できるように、必要最小限の知識や研究の背景についてはできるだけ説明を加えた。構造式に慣れ親しんでもらうため多くの構造を掲載し、それぞれが異なる機能を発揮することのみを端的に示したため、考察の詳細は原報を参照いただきたい。有機化学は高校化学で三大カテゴリーの一つだが、有機化学分野全体から見ればほんの一部しか触れられておらず、大学で専攻しなければ学ぶ機会を得にくい学問といえる。私たちの研究そのものは、普段の生活に関りのない話に思えたかもしれないが、世の中に日々生み出される新素材、例えば洗剤や衣類、もちろん医薬品も、有機化学の知識を使って開発されたものである。私たちの生活の身近で役立っている学問として、有機化学の興味深さが伝わることを願う。

#### 引用文献

- 1) Zimmer, M. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 759.
- 2) Walker, C. L.; Lukyanov, K. A.; Yampolsky, I. V.;

Mishin, A. S.; Bommarius, A. S.; Duraj-Thatte, A. M.; Azizi, B.; Tolbert, L. M.; Solntsev, K. M., *Current Opinion in Chem. Biol.*, **2015**, *27*, 64-74.

- 3) Fang, X. X.; Wang, Y.; Wang, D.; Zhao, G. Y.; Zhang, W. W.; Ren, K. M.; Wang, H. Y.; Xu, J. W.; Gao, B.-R.; Yang, W., *J. Phys. Chem. Lett.*, **2014**, *5*, 92-98.
- 4) Baranov, M. S.; Solntsev, K. M.; Baleeva, N. S.; Mishin, A. S.; Lukyanov, S. A.; Lukyanov, K. A.; Yampolsky, I. V., *Chem. Eur. J.*, **2014**, *20*, 13234-13241.
- 5) Ikejiri, M.; Tsuchino, M.; Chihara, Y.; Yamaguchi, T.; Imanishi, T.; Obika, S.; Miyashita, K. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 4406-4409.
- 6) Ikejiri, M.; Matsumoto, K.; Hasegawa, H.; Yamaguchi, D.; Tsuchino, M.; Chihara, Y.; Yamaguchi, T.; Mori, K.; Imanishi, T.; Obika, S.; Miyashita, K. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 4987-4998.
- 7) Okuda, T.; Mori, S.; Kasahara, Y.; Morihira, K.; Ikejiri, M.; Miyashita, K.; Obika, S. *Tetrahedron Lett.*, **2016**, *57*, 3129-3132.
- 8) Ikejiri, M.; Nishiguchi R.; Kubota C.; Fujisaka A.; Miyashita, K. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 8443-8449.
- 9) Ikejiri, M.; Mori, K.; Miyagi, R.; Konishi, R.; Chihara, Y.; Miyashita, K. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 6948-6958.
- 10) Ikejiri, M.; Watanabe, A.; Katsuda, M.; Funakoshi, M.; Fujisaka, A.; Miyashita, K. *Heterocycles*, **2021**, *102*, 516-526.

(2022年3月2日 受理)