87　ガス分子のクロストークを解明する蛍光プローブの開発	奥田　健介

【目的】NO、CO に続き H_2S が第三のガス状生理活性物質として近年注目を集めている。H_2S による様々な生理機能がこれまでに明らかになってきたが、その働きに関して未解明な点が多い。このような状況のもと、生体内での H_2S の働きを解明するべく生細胞内の H_2S を可視化する蛍光プローブが開発されて、本分野の研究は大きく進展してきた。

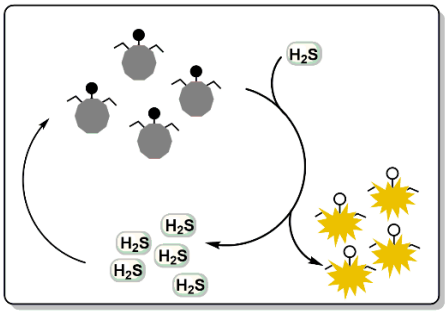
しかしながら、現在開発されているプローブでは生理的条件下での微量の H_2S を精度よく検出するには感度が不足している。さらに、酸化ストレス応答等において NO、CO、H_2S それぞれ単独の働きのみならず、これら分子のクロストークによる様々な生体制御が近年明らかになってきたが、細胞内でのこれら活性種の時空間的な制御に関しては明らかになっていない。とりわけ、H_2S と CO は互いにその産生酵素を通して feedback しあう関係にあることが明らかになってきており、これらのクロストークに興味が持たれる。

そこで、このようなクロストークの機構と生理的意義を明らかにするべく、これら活性種のそれぞれに対応する複数の蛍光プローブを用いて蛍光顕微鏡によって観察するマルチカラーイメージングの基盤を確立することを目指し、本研究ではこれらガス状シグナル分子のライブセル マルチカラーイメージングによる時空間的解析の研究基盤となる H_2S 蛍光プローブを開発することを目的とした。本研究によって H_2S が関わるクロストークを明らかにできれば、ガス状シグナル分子を基軸とする生命システムの制御機構解明研究に大きく貢献し、発がんや老化、生活習慣病など様々な疾病治療に波及効果をもたらすことが期待される。

【方法】本研究では xanthene 系の蛍光色素を活用し、高感度化を指向した turn on 型の H_2S プローブの設計を行った。本化合物は H_2S 選択的に脱保護反応が進行することにより連鎖的に H_2S と蛍光を増幅して H_2S を高感度に検出できることが期待される。すなわち、H_2S をトリガーとして 1,4-脱離反応が進行し、等量以上の H_2S 等価体が放出されると同時に消光されていたプローブ分子が蛍光性の化合物へと変換され、放出された H_2S はさらに未反応のプローブ分子と反応し、連鎖的に H_2S と蛍光を増幅して高感度に検出できる H_2S 増幅型センサー分子である。

【結果】まず、fluorescein を Duff 反応に付してホルミル化を試みたところ、得られた生成物は溶解性などの物性に乏しく、目的とするテトラホルミル体を得ることができなかった。そこで、2',7'-dichlorofluorescein を用いて反応を行ったところ目的化合物が収率良く得られ、ついで $NaBH_4$ 還元を行ってヒドロキシメチル体へと導いた。また、生体イメージングに有利な近赤外蛍光を活用するべく、10 位 O を置換した xanthene 系色素の合成にも取り掛かり、中間体へと導いた。今後、各工程の収率の向上を図るべく合成ルートの見直しを行うと同時に、さらなる変換を行って標的プローブの合成を達成し、続いて H_2S との反応性の評価を行って、シグナル増幅能を持たない既存の H_2S 蛍光プローブと比較し評価する。さらに、*in vitro* 培養細胞系での H_2S 検出実験に適用し、プローブの妥当性を検討していく。

H_2S 増幅型蛍光プローブ



87. ガス分子のクロストークを解明する蛍光プローブの開発

奥田　健介

神戸薬科大学 薬学部 薬化学研究室

Key words：イメージング，蛍光，高感度化，シグナル伝達

緒　言

一酸化窒素（NO）、一酸化炭素（CO）に続き硫化水素（H_2S）が第三のガス状生理活性物質として近年注目を集めている。H_2S による様々な生理機能がこれまでに明らかになってきたが、その働きに関して未解明な点が多い。このような状況のもと、生体内での H_2S の働きを解明するべく生細胞内の H_2S を可視化する蛍光プローブが開発されて、本分野の研究は大きく進展してきた［1］。

しかしながら、現在開発されているプローブでは生理的条件下での微量の H_2S を精度よく検出するには感度が不足している。さらに、酸化ストレス応答等において NO、CO、H_2S それぞれ単独の働きのみならず、これら分子のクロストークによる様々な生体制御が近年明らかになってきたが、細胞内でのこれら活性種の時空間的な制御に関しては明らかになっていない。中でも、CO は主として生体内で HO（heme oxygenase）によって産生され、この CO が H_2S 産生酵素であるシスタチオニンγリアーゼ（CSE）のリン酸化を介して H_2S 産生を抑制すること［2］や、シスタチオニンβシンターゼ（CBS）を阻害することで、H_2S の産生を阻害するとともに抗酸化活性が増強され、がん細胞の化学療法や放射線抵抗性を獲得すること［3］が報告されている。一方、H_2S によって HO-1 が upregulation されるという報告［4］もあり、以上にみられるように H_2S と CO は互いに feedback しあう関係であり、これらのクロストークに興味が持たれる。

そこで、このようなクロストークの機構と生理的意義を明らかにするべく、これら活性種のそれぞれに対応する複数の蛍光プローブを用いて蛍光顕微鏡によって観察するマルチカラーイメージングの基盤を確立することを目指し、本研究ではこれらガス状シグナル分子のライブセル マルチカラーイメージングによる時空間的解析の研究基盤となる H_2S 蛍光プローブを開発することを目的とした。本研究によって H_2S が関わるクロストークを明らかにできれば、ガス状シグナル分子を基軸とする生命システムの制御機構解明研究に大きく貢献し、発がんや老化、生活習慣病など様々な疾病治療に波及効果をもたらすことが期待される。

方　法

1. プローブの設計（図 1）

本研究では、培養細胞に適用可能な CO 蛍光プローブとして開発されている BODIPY（boron-dipyrromethene）ベースの蛍光プローブ **1**［5］を活用するべく、BODIPY とは蛍光波長が重ならない xanthene 系の蛍光色素を活用し、高感度化を指向した turn on 型の xanthene 系の H_2S プローブ **2** の設計を行った。本化合物は H_2S 選択的に脱保護反応が進行することにより連鎖的に H_2S と蛍光を増幅して H_2S を高感度に検出できることが期待される。すなわち、H_2S をトリガーとして 1,4-脱離反応が進行し、等量以上の H_2S 等価体が放出されると同時に消光されていたプローブ分子 **2** が蛍光性の化合物へと変換され、放出された H_2S はさらに未反応のプローブ分子 **2** と反応し、連鎖的に H_2S と蛍光を増幅して高感度に検出できる H_2S 増幅型センサー分子であり、BODIPY プローブとのマルチカラーイメージングが可能となる。

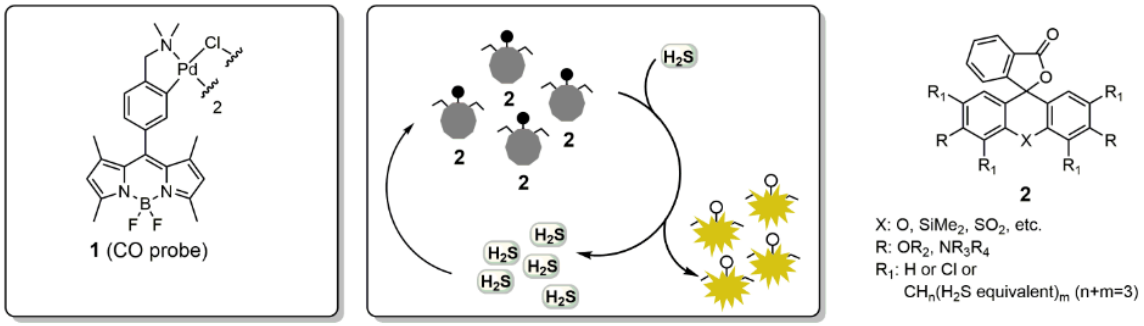


図 1. CO 蛍光プローブ **1** と H_2S 増幅型蛍光プローブ **2**

結果および考察

1. Fluorescein ベースの H_2S 増幅型蛍光プローブの中間体合成（図 2）

まず、BODIPY と波長は重なるものの xanthene 系蛍光色素の代表的な化合物の一つである fluorescein（**3**）を選択し、Duff 反応に付してホルミル化を試みたところ、得られた生成物は溶解性などの物性に乏しく、目的とするテトラホルミル体を得ることができなかった。そこで、2',7'-dichlorofluorescein（**4**）を用いて反応を行ったところ目的化合物 **5** が 82%で得られ、ついで $NaBH_4$ 還元を行ってヒドロキシメチル体 **6** へと導いた。今後、Appel 反応を用いてヒドロキシメチル基をハロメチル基に変換し、続いて H_2S 等価体を導入してプローブ分子 **2**（X : O）へと導く。

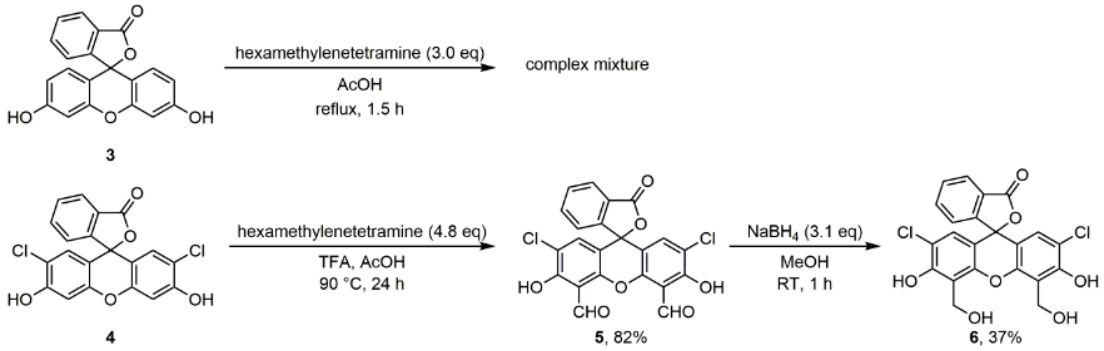


図 2. Fluorescein ベースの H_2S 増幅型蛍光プローブの中間体合成

2. SO_2-rhodamine および Si-rhodamine ベースの H_2S 増幅型蛍光プローブの中間体合成（図 3）

また、生体イメージングに有利な近赤外蛍光を活用するべく、10 位 O を SO_2 に置換した xanthene 系蛍光化合物である SO_2-rhodamine［6］の合成に取り掛かった。まず対照化合物として *N,N,N',N'*-tetramethyl-SO_2-rhodamine の合成を目指し、4,4'-methylenedianiline（**7**）より出発して定法にしたがって *N,N,N',N'*-tetramethyl 体 **8** を合成後、発煙硫酸との反応により目的とする環化中間体 **9** を得た。官能基変換を考慮して、別途調製した *N,N,N',N'*-tetrabenzyl 体 **10** を用い、同様の環化反応を様々な条件下に検討を行ったが基質の溶解性がいずれも乏しく、目的とする中間体を得ることができなかった。

そこで、10 位 O を $SiMe_2$ に置換した xanthene 系蛍光化合物である Si-rhodamine［7］の合成に取り掛かった。こちらは SO_2-rhodamine と比較して多少波長は短いものではあるが同様に近赤外蛍光を有しており、SO_2-rhodamine と同様に生体イメージングに有利であるものと考えた。まず対照化合物として *N,N,N',N'*-tetramethyl-Si-rhodamine の合成を目指し、*o*-tolualdhyede（**11**）と 3-bromo-*N,N*-dimethylaniline（**12**）とを縮合させ、目的化合物 **13** を得た。官能基変換を考慮して、同様の反応を *N,N*-diallyl-3-bromoaniline（**14**）を用いて行ったが、反応が複雑になり目的物を得ることができなかった。そこで *N,N*-dibenzyl-3-bromoaniline（**15**）を用いて反応を行ったところ、目的とするテト

ラベンジル体 **16** を得ることができた。次いで、リチオ化を経て Me_2SiCl_2 との反応により、*N,N,N',N'*-tetrabenzyl-Si-rhodamine 骨格 **17** の構築に成功した。

今後、各工程の収率の向上を図るべく合成ルートの見直しを行うと同時に、さらなる変換を行って標的プローブの合成を達成し、続いて H_2S との反応性の評価を行って、シグナル増幅能を持たない既存の H_2S 蛍光プローブと比較し評価する。さらに、*in vitro* 培養細胞系での H_2S 検出実験に適用し、プローブの妥当性を検討していく。

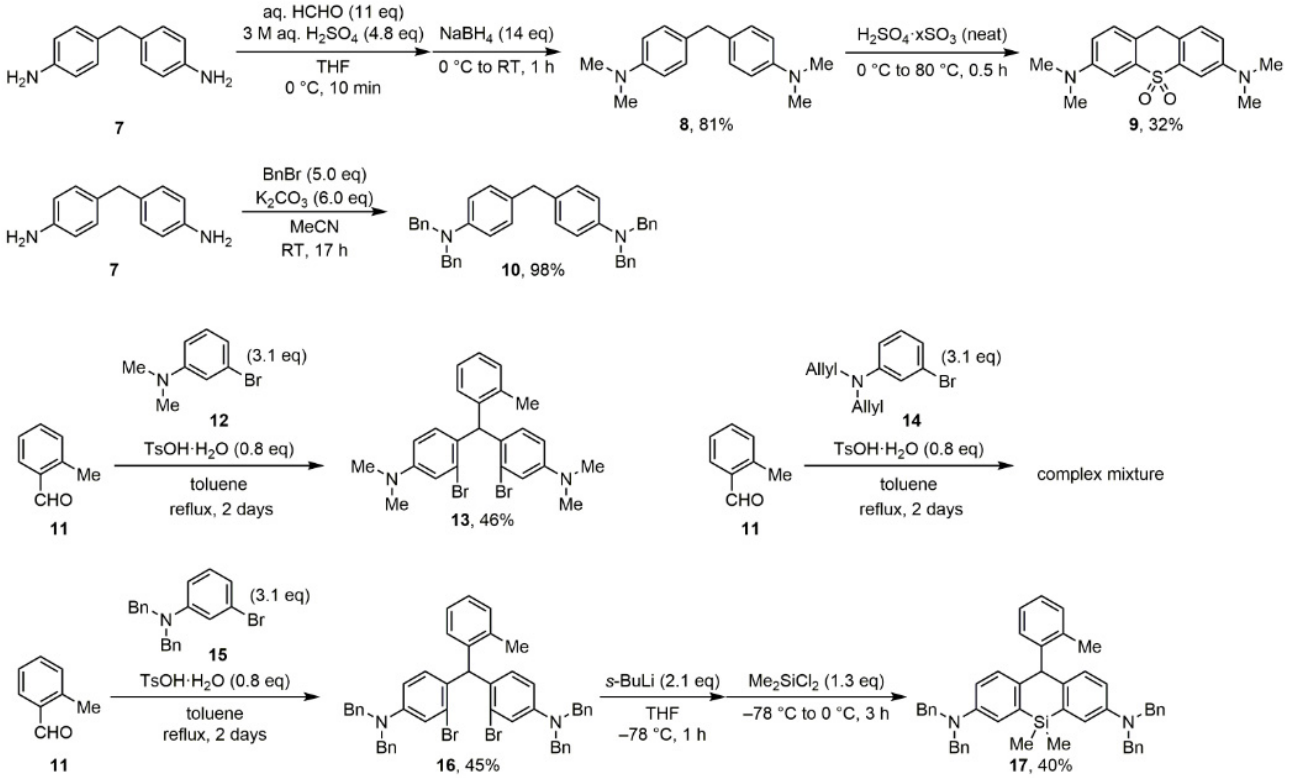


図 3. SO_2-rhodamine および Si-rhodamine ベースの H_2S 増幅型蛍光プローブの中間体合成

なお本研究に関連し、シグナル増幅能を持たない H_2S 蛍光プローブの反応性を検討した中の一つに、生理的条件下でのグルタチオンが存在する条件下で遷移金属種により大幅な蛍光上昇がみられた。このプローブは H_2S 選択的な還元反応により蛍光応答がみられるものであり、この条件下においても同様の還元反応が進行した結果であると考えられ、遷移金属種の新規な蛍光検出法につながりうる。一方、H_2S の発生には種々の遷移金属のレドックス反応が密接に関連していると予想される。そのため反応の選択性をさらに改善する必要があり、こちらに関しても検討を開始したところである。

その一方、ニトロ芳香環の還元反応をトリガーとする新規な CO 蛍光プローブがごく最近報告された [8]。ニトロ芳香環は低酸素環境下で選択的にアミンへと酵素的に還元されることが古くより知られており、このメカニズムに基づいて生体でのがんや網膜の低酸素蛍光イメージングに適用可能なプローブを私たちは開発しており [9, 10]、これらプローブの CO に対する反応性にも興味が持たれる。低酸素環境は還元的な環境下であり、H_2S も含めて CO の細胞内での挙動はその産生系・消去系も含めて大きく影響を受けると考えられ、低酸素も考慮したシグナルネットワークの詳細を私たちが創製するプローブを活用して将来的に明らかにしていければと考えている。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、神戸薬科大学 薬化学研究室 特任助教（現・助教）の高木晃博士および研究室所属の学生諸氏である。研究室立ち上げにあたり種々の機器を導入する必要がある状況のもとで本研究を遂行するにあたり、多大なる援助を賜りました公益財団法人 上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

1) Hartle MD, Pluth MD. A practical guide to working with H_2S at the interface of chemistry and biology. Chem Soc Rev. 2016 Nov 7;45(22):6108-6117. Epub 2016 May 11. PMID: 27167579 DOI: 10.1039/c6cs00212a.

2) Yuan G, Vasavda C, Peng YJ, Makarenko VV, Raghuraman G, Nanduri J, Gadalla MM, Semenza GL, Kumar GK, Snyder SH, Prabhakar NR. Protein kinase G–regulated production of H_2S governs oxygen sensing. Sci Signal. 2015 Apr 21;8(373):ra37. Epub 2015 Apr 21. PMID: 25900831 DOI: 10.1126/scisignal.2005846.

3) Yamamoto T, Takano N, Ishiwata K, Ohmura M, Nagahata Y, Matsuura T, Kamata A, Sakamoto K, Nakanishi T, Kubo A, Hishiki T, Suematsu M. Reduced methylation of PFKFB3 in cancer cells shunts glucose towards the pentose phosphate pathway. Nat Commun. 2014 Mar 17; 5:3480. Epub 2014 Mar 17. PMID: 24633012 DOI: 10.1038/ncomms4480.

4) D'Araio E, Shaw N, Millward A, Demaine A, Whiteman M, Hodgkinson A. Hydrogen sulfide induces heme oxygenase-1 in human kidney cells. Acta Diabetol. 2014 Feb;51(1):155-157. Epub 2013 Jul 13. PMID: 23852531 DOI: 10.1007/s00592-013-0501-y.

5) Michel BW, Lippert AW, Chang CJ. A reaction-based fluorescent probe for selective imaging of carbon monoxide in living cells using a palladium-mediated carbonylation. J Am Chem Soc. 2012 Sep 26;126(4):663-676. Epub 2012 Sep 13. PMID: 22970765 DOI: 10.1021/ja307017b.

6) Liu J, Sun YQ, Zhang H, Shi H, Shi Y, Guo W. Sulfone-Rhodamines: A New Class of Near-Infrared Fluorescent Dyes for Bioimaging. ACS Appl Mater Interfaces. 2016 Sep 7;8(35):22953-22962. Epub 2016 Aug 26. PMID: 27548811 DOI: 10.1021/acsami.6b08338.

7) Koide Y, Urano Y, Hanaoka K, Terai T, Nagano T. Evolution of group 14 rhodamines as platforms for near-infrared fluorescence probes utilizing photoinduced electron transfer. ACS Chem Biol. 2011 Jun 17;6(6):600-608. Epub 2011 Mar 17. PMID: 21375253 DOI: 10.1021/cb1002416.

8) Dhara K, Lohar S, Patra A, Roy P, Saha SK, Sadhukhan GC, Chattopadhyay P. A New Lysosome-Targetable Turn-On Fluorogenic Probe for Carbon Monoxide Imaging in Living Cells. Anal Chem. 2018 Feb 20;90(4):2933-2938. Epub 2018 Feb 1. PMID: 29353475 DOI: 10.1021/acs.analchem.7b05331.

9) Okuda K, Okabe Y, Kadonosono T, Ueno T, Youssif BG, Kizaka-Kondoh S, Nagasawa H. 2-Nitroimidazole-tricarbocyanine conjugate as a near-infrared fluorescent probe for in vivo imaging of tumor hypoxia. Bioconjugate Chem. 2012 Mar 21;23(3):324-329. Epub 2012 Feb 22. PMID: 22335430 DOI: 10.1021/bc2004704.

10) Fukuda S, Okuda K, Kishino G, Hoshi S, Kawano I, Fukuda M, Yamashita T, Beheregaray S, Nagano M, Ohneda O, Nagasawa H, Oshika T. In vivo retinal and choroidal hypoxia imaging using a novel activatable hypoxia-selective near-infrared fluorescent probe. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2016 Dec;254(12):2373-2385. Epub 2016 Aug 29. PMID 27572140 DOI: 10.1007/s00417-016-3476-x.