

ホウ素をセンシング部位とする蛍光プローブの分子デザインと適用に関する研究

下村 有輝

生命科学分野で用いられる蛍光性センサー分子は、その利用目的に応じた様々な性質が求められる。特定の刺激に対して特異的な変化を示す刺激応答基の活用は、蛍光性センサー分子の設計に有用である。刺激応答基の一つとして、ボロン酸残基が注目されている。ボロン酸誘導体は、糖等有する複数のヒドロキシ基 (ポリオール) と可逆的に環状ボロン酸エステル結合を形成することが知られている。また、フェニルボロン酸誘導体は、過酸化水素 (H_2O_2) 等の活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) との反応により、不可逆的なボロン酸残基の脱離が生じ、フェノール誘導体へと変換される。ボロン酸残基を有する蛍光性分子は、ポリオールや H_2O_2 との反応により、蛍光特性の変化を示すセンサー分子として機能する。本研究では、ホウ素をセンシング部位とする 2 種類の新規蛍光性センサー分子のデザインとポリオールや H_2O_2 に対する応答性の評価を行い、そのセンサー分子の適用に関する検討を行った。

第 1 章: 近赤外領域 (650~900 nm) に光学特性を示すボロン酸修飾シアニン系蛍光プローブ (CyBA) の分子デザイン

これまでに報告されたボロン酸含有蛍光性センサー分子の多くは、紫外領域から 500 nm 付近の可視領域に光学特性を示すものであった。しかしながら、これらの波長領域の光は、生体の窓の範囲外であり、生体成分による妨害を受けやすいことが懸念される。この課題を克服するためには、近赤外領域に吸収及び蛍光特性を示す分子設計が望ましい。インドシアニングリーンのようにヘプタメチンシアニン骨格を有する化合物は、近赤外領域に光学特性を示す。本章では、ヘプタメチンシアニン骨格を有する IR-780 にボロン酸部位を化学修飾し、近赤外領域で機能する蛍光性センサー分子 (CyBA) を合成した。CyBA は、まず 2-(Aminomethyl)phenylboronic acid を 2 段階の反応で合成し、これを IR-780 と反応させることで得た。得られた CyBA は、質量分析、NMR、元素分析にて構造決定を行った。CyBA は、中性条件下で近赤外領域に吸収極大 (λ_{abs} 659 nm) と蛍光極大 (λ_{em} 726 nm) を示し、各種ポリオールの濃度上昇に伴い、蛍光強度の増大と蛍光極大の短波長変化 (λ_{em} 700 nm) を示した。各種ポリオールに対する結合定数を比較すると、ソルビトール、フルクトース (Fru)、*N*-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac) に対して比較的高い値を示し、これらのポリオールに対して高い親和性を示すことが示唆された。また、CyBA は、 H_2O_2 存在下でボロン酸残基からフェノール性水酸基への変換に基づく蛍光変化を示すと予想されたが、ポリオール非存在下における CyBA は、 H_2O_2 を添加しても蛍光変化を示さなかった。一方、Fru 共存下で環状エステルを形成した CyBA は、 H_2O_2 の添加後、継時的な蛍光強度の減少を示した。このことから、CyBA は、環状エステルを形成することで H_2O_2 反応性が高まることが示唆された。

第 2 章: ホウ素含有新規骨格 (ボリン酸含有キサントゲン骨格) による蛍光プローブ (JoSai-Red: JS-R) の分子デザイン

近年、ローダミン誘導体の蛍光団であるピロニン構造内の酸素原子をケイ素等に置換することで、近赤外領域付近に光学特性を示し、蛍光プローブ開発で注目されている。著者は、ピロニン構造内の酸素原子をボリン酸アニオン [$R_2B(OH_2)^-$] に置換することで、蛍光団内に分子認識部位としてホウ素を導入した新規蛍光性センサー分子 (JoSai-Red; JS-R) を得られると考えた。JS-R は、3-(*N,N*-dimethylamino)-phenylboronic acid と formaldehyde を反応させることで得た。JS-R は、NMR、質量分析、元素分析から構

造決定を行った。JS-R は、611 nm に吸収極大、630 nm に蛍光極大を示し、その蛍光量子収率は 0.59 と高値を示した。JS-R は、pH 5.5 から pH 11.0 の範囲において一定の蛍光特性を示し、50 mM Fru 共存下では、同 pH 範囲内で蛍光強度が一定して減少した。この pH 非依存的な蛍光変化を調査するため、蛍光スペクトル測定を行った。JS-R は、pH 7.4 において Fru 濃度の上昇に伴い蛍光強度の減少と蛍光極大の 642 nm への長波長変化を示した。この蛍光変化のメカニズムを考察するために量子化学計算を行った。Fru と複合体を形成した JS-R は、JS-R 単独と比べて HOMO-LUMO エネルギーギャップが減少する計算結果が得られた。このエネルギーギャップの減少が、蛍光極大の長波長変化をもたらしたと考えられる。また、中性条件下において、JS-R の各種ポリオールに対する結合定数を比較したところ、Fru に対して高い結合定数を示した。更に著者は、JS-R においても蛍光性ボロン酸誘導体と同様に、 H_2O_2 の有無により構造変化に基づいた蛍光変化を示すと予想した。JS-R は、中性条件下で H_2O_2 を添加することにより、吸収極大が 564 nm へ短波長変化を示した。また、564 nm での励起により JS-R の蛍光スペクトルを測定した際、 H_2O_2 の添加により蛍光極大が 630 nm から 584 nm へ短波長変化した。第 1 章同様、JS-R においても Fru の有無による H_2O_2 反応性を調査した。JS-R は Fru 非存在下すなわち環状エステルを形成していない方が、 H_2O_2 との反応が速やかであることがわかった。また、JS-R を H_2O_2 と反応させた後、高分解能質量分析を行ったところ、反応生成物はボリン酸残基が脱離し、エーテル結合に置換された O-pyronine であることがわかった。したがって、JS-R は H_2O_2 との反応により、O-pyronine への構造変化に基づいた蛍光変化を示すことが明らかとなった。

第 3 章: CyBA 及び JS-R の適用に関する検討

悪性腫瘍患者では、シアル酸総量が増加しており、糖鎖の結合様式の変化が顕著に生じる。そのため、シアル酸を認識する蛍光プローブは、癌細胞検出に有用であると考えられる。本章の検討で CyBA は、JS-R 及び蛍光性ボロン酸誘導体である 4-Isoquinolineboronic acid と比較して、Neu5Ac に対する選択性が高いことがわかった。CyBA は、生体の窓の範囲内である 660 nm の光を選択的に透過するバンドパスフィルターとキセノン光源を用いることで、Neu5Ac の有無によりコントラストの異なる蛍光像を得られると予想した。CyBA は、溶液中及び生体組織を模倣したゲル内で、Neu5Ac との結合により明度の高い蛍光像を観察できた。このことから、CyBA は細胞糖鎖に含まれる Neu5Ac 認識に基づいた *in vivo* 蛍光イメージングへの適用が期待される。

グルコースオキシダーゼ (GOx) と Glc の酵素反応を利用したバイオセンシングは、血糖測定のような生体成分の高感度測定に有用である。本章の検討で、CyBA 及び JS-R の H_2O_2 反応性を反応速度定数の比較から、ポリオールと環状エステルを形成していない JS-R の反応速度定数が高いことが示された。JS-R は、GOx 存在下で Glc の添加により H_2O_2 添加時と同様の蛍光スペクトル変化を示し、Glc 濃度 1 mM 以上で蛍光強度比 (584 nm/630 nm) が一定となった。これは、GOx の酵素反応で生成された H_2O_2 と JS-R が反応し、O-pyronine へ構造が変化したことによるものと考えられる。以上のことから、JS-R は、 H_2O_2 検出に基づいた Glc の高感度検出への適用が期待できる。

以上本研究をまとめると、ホウ素をセンシング部位とした CyBA 及び JS-R は、ポリオールや ROS の直接的な検出や酵素反応等を利用したバイオセンシングへの適用が期待できる。これらは、分子改良及び測定条件の最適化を行うことで、将来的に疾病の診断や動態解析の新たなツールとして応用可能になると期待する。

Molecular designs and their applications of new fluorescent probes with boron for biomolecular sensing

Naoki Shimomura

As for the fluorescent sensor molecules used in the field of life science, various properties suitable for the application purpose are required. It is useful for the design of fluorescent sensor molecules to utilize stimuli responsive groups indicating a characteristic response for specific stimulation. Boronic acid group has attracted attention as a stimuli responsive group. Boronic acid derivatives react with multiple hydroxyl groups (polyol) of saccharides to form cyclic boronate reversibly. Phenylboronic acid derivatives can also react with reactive oxygen species (ROS) including hydrogen peroxide (H_2O_2). Then, the elimination of boronic acid group irreversibly occurs because of ROS and phenylboronic acids are transformed to phenol derivatives. Boronic acid modified fluorescent molecules show fluorescent changes when they react with polyol and H_2O_2 . Thus, they act as fluorescent sensors. In this study, I designed two new fluorescent sensor molecules with boron as a sensing moiety and evaluated the responsiveness for polyol and H_2O_2 . In addition, I studied in related to the applications of these sensor molecules.

Section 1: A molecular design of boronic acid modified heptamethine cyanine fluorescent probe that shows optical properties in near-infrared region (650-900 nm)

A lot of fluorescent sensor molecules with boronic acid show the optical properties in ultraviolet and shorter wavelength in visible region. However, the light of these wavelength ranges is easy to interfere due to outside of biological window. Designing of molecule that shows the absorption and fluorescence properties in near-infrared region will overcome the above problem. The compounds including heptamethine-cyanine skeleton as indocyanine green are known to show the optical properties in near-infrared region. In this section, I tried the synthesis of a new fluorescent sensor molecule that show the optical properties in near-infrared range by modified boronic acid moiety to IR-780 composing heptamethine skeleton. First, 2-(aminomethyl)phenylboronic acid as boronic acid moiety was synthesized through two steps. Next, CyBA was provided from the reaction of 2-(aminomethyl)phenylboronic acid and IR-780 iodide. The structural determination of CyBA was carried out NMR, MS and elemental analysis. The absorption maximum (λ_{abs}) and fluorescence maximum (λ_{em}) of CyBA were shown in near-infrared region (λ_{abs} 659 nm, λ_{em} 726 nm). And CyBA showed the increase in fluorescence intensity and the blue-shift of λ_{em} with an increasing in concentration of polyols at neutral pH. CyBA showed relative high value of binding constant against sorbitol, fructose (Fru) and *N*-acetylneuraminic acid (Neu5Ac). Thus, CyBA was indicated to show high affinity of these polyols. I considered that CyBA showed a fluorescence change based on structural change from a boronic acid residue to a phenolic hydroxy group in the presence of H_2O_2 . However, CyBA in the absence of polyol was not shown it. In contrast, CyBA which formed cyclic boronate in the presence of Fru showed the time-dependent decrease in fluorescence intensity after addition of H_2O_2 . It was suggested that H_2O_2 reactivity of CyBA increased by forming cyclic boronate between CyBA and polyol.

Section 2: A molecular design of fluorescent probe composing of new framework containing borinate (xanthene skeleton comprising borinate)

Recently, the fluorescent dyes that were substituted the oxygen atom in the pyronine skeleton that is fluorophore of rhodamine derivatives for silicon showed the optical properties, and have attracted attention in fluorescent probe development. I considered that a new fluorescence dye (JoSai-Red; JS-R) included boron as molecular recognition

moiety will be able to provide, by substituted the oxygen within pyronine with borinate anion $[R_2B(OH_2)]^-$. JS-R was synthesized from 3-(*N,N*-dimethylamino)phenylboronic acid and formaldehyde. The structural determination of JS-R was carried out NMR, MS and elemental analysis. JS-R showed the λ_{abs} at 611 nm and the λ_{em} at 630 nm when excited with 611 nm light, and its quantum yield was 0.59. JS-R showed steady fluorescent property in range to pH 11.0 from pH 5.5. In this range, the fluorescence intensity of JS-R constantly decreased in the presence of Fru (50 mM). To investigate the pH independent fluorescence change, the fluorescence spectra of JS-R were measured. JS-R showed the decrease in fluorescence intensity and the red-shift of λ_{em} to 642 nm with increasing in concentration of Fru at pH 7.4. I performed the quantum chemical calculation to discuss of fluorescent change mechanism. It was found from the calculation that the HOMO-LUMO energy gap of the complex of JS-R and Fru was smaller than the one of JS-R alone. It is indicated this a decrease of the energy gap by forming a complex of JS-R and Fru caused the red-shift of λ_{em} . Furthermore, I considered that JS-R shows fluorescent change based on the structural change after addition of H_2O_2 as fluorescent boronic acids. The λ_{abs} of JS-R shifted to 564 nm after addition of H_2O_2 at neutral pH. Then, JS-R showed the λ_{em} at 584 nm when excited with 564 nm after addition of H_2O_2 . As in the case of section 1, I investigated the reactivity of JS-R for H_2O_2 in the absence and presence of Fru. It was found that JS-R did not form the cyclic boronate with Fru was fast in a reaction with H_2O_2 . Then, high resolution MS was performed to analyze the structure of reaction product. The product was O-pyronine that was substituted borinate with ether bond.

Section 3: Applications of CyBA and JS-R

In the malignant patients, the total amount of sialic acids is increasing, and the mutation of binding pattern in saccharide chain is significant. Thus, the fluorescent probe for recognition of sialic acids is necessary to detect for cancer cells. In this section, CyBA was showed higher selectivity for Neu5Ac than JS-R and a general fluorescent boronic acid (4-isoquinolineboronic acid). I expected that it is possible to observe a different fluorescence image of the contrast in CyBA between the absence and presence of Neu5Ac by using a band pass filter (λ 660 nm) within the biological window and a Xe source. CyBA in the presence of Neu5Ac showed clear fluorescence image in the solution and the biological tissue mimic gel. CyBA was expected the application to an in vivo fluorescent imaging based on the recognition of Neu5Ac in saccharide chain on cell surface.

The biosensing based on enzymatic reaction such as glucose oxidase (GOx) and Glc is useful for the high-sensitivity measurement of the biological components like the blood sugar measurement. In this section, the reaction rate constant value against H_2O_2 of JS-R without cyclic boronate was showed higher than CyBA and cyclic boronate formed JS-R. The fluorescent spectral change of JS-R in the presence of GOx and Glc was as same as that in the presence of H_2O_2 (section 2), and the fluorescence intensity ratio (584 nm/630 nm) became constant in 1-20 mM Glc. It was considered that JS-R reacted with H_2O_2 that produced by enzymatic reaction of GOx, and JS-R transformed to O-pyronine. Thus, JS-R may enable the high detection of Glc based on H_2O_2 recognition.

In summary, CyBA and JS-R including boron as a molecular sensing moiety will be expected application to the direct detection of polyols and ROS and the biosensing based on enzymatic reaction. I hope that JS-R and CyBA will become applicable as new tools for the diagnosis and the dynamic analysis after molecular improvement and optimization of measurement condition in the future.

論文審査の結果の要旨

生命科学分野で用いられる蛍光性センサー分子は、その利用目的に応じた様々な性質が求められる。蛍光性センサー分子の設計には、特定の刺激に対して特異的な変化を示す刺激応答基の活用が有用である。近年、刺激応答基の一つとして、ボロン酸残基が注目されている。ボロン酸誘導体は、糖等有する複数のヒドロキシ基 (ポリオール) と可逆的に環状ボロン酸エステル結合を形成すること、また、フェニルボロン酸誘導体は、過酸化水素 (H_2O_2) 等の活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) との反応により、不可逆的なボロン酸残基の脱離が生じ、フェノール誘導体へと変換されることなどが知られており、ボロン酸残基を有する蛍光性分子は、ポリオールや H_2O_2 との反応により蛍光特性の変化を示すセンサー分子として機能することが期待される。しかし、これまでに開発されてきたボロン酸含有蛍光性センサー分子の多くは、光学特性を示す波長領域がいわゆる生体の窓 (650-900 nm) の範囲外である紫外領域から 500 nm 付近の可視領域にあることから、測定の際に生体成分による妨害を受けやすいことが懸念される。従って、生体内での使用を目的とした蛍光性センサー分子の開発には、近赤外領域にて吸収ならびに蛍光を示す分子設計が望ましいと考えられる。本研究は、近赤外領域に光学特性を有し、ホウ素をセンシング部位とする 2 種類の新規蛍光性センサー分子のデザインを行い、合成した新規蛍光性センサー分子のポリオールや H_2O_2 に対する応答性を評価することで、そのセンサー分子としての適用可能性について検討したものである。

第 1 章では、近赤外領域にて吸収ならびに蛍光を示すことが知られているヘプタメチンシアニン骨格を有する IR-780 (λ_{abs} ca. 780 nm, λ_{em} ca. 820 nm) にボロン酸部位を化学修飾した蛍光性センサー分子 (CyBA) を合成し、各種評価を行っている。まず初めに、別途合成した 2-(aminomethyl)phenylboronic acid を IR-780 と反応させ、得られた CyBA を質量分析、NMR、元素分析にて構造決定した後、光学特性、各種ポリオールに対する結合性、 H_2O_2 による影響などに関する検討を行っている。その結果、CyBA は中性条件下において近赤外領域に光学特性 (λ_{abs} 659 nm, λ_{em} 726 nm) を示し、各種ポリオールの濃度上昇に伴い蛍光強度の増大と蛍光極大波長の短波長変化 (λ_{em} 700 nm) を示すこと、また、各種ポリオールに対する結合定数の比較から、ソルビトール (Sor)、フルクトース (Fru)、*N*-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac) に対して高い親和性を示すことを明らかとしている。一方、CyBA は H_2O_2 存在下でボロン酸残基からフェノール性水酸基への変換に基づく蛍光変化を示すことが予想されたが、ポリオール非存在下においては H_2O_2 を添加しても蛍光変化を示さず、Fru 共存下で環状エステルを形成した際において H_2O_2 添加による継時的な蛍光強度の減少を示すことが判明し、これらの結果から、CyBA の H_2O_2 に対する反応性は、環状エステルを形成することで高まることが示唆されている。

第 2 章では、ローダミン誘導体の蛍光団であるピロニン構造内の酸素原子をケイ素等に置換することで近赤外領域付近に光学特性を示すようになることが報告されていることから、ローダミン誘導体のピロニン構造内の酸素原子をボリン酸アニオン [$\text{R}_2\text{B}(\text{OH})_2$] に置換することで分子認識部位としてホウ素を導入した新規蛍光性センサー分子が得られるのではと考え、JoSai-Red (JS-R) を合成し、CyBA と同様に評価を行っている。まず、3-(*N,N*-dimethylamino)-phenylboronic acid と formaldehyde を反応させ JS-R を合成し、NMR、質量分析、元素分析にて構造決定した後、各種検討を行っている。その結果、JS-R は 611 nm に吸収極大、630 nm に蛍光極大を示し、その蛍光量子収率は 0.59 と高値を示すこと、pH 5.5 から pH 11.0 の範囲において一定の蛍光特性を示し、50 mM Fru 共存下では同 pH 範囲内で蛍光強度が一定

して減少することを見出している。そこで、この pH 非依存的な蛍光変化に関し蛍光スペクトル測定を行うことで検討を進め、JS-R は Fru 濃度の上昇に伴い蛍光強度の減少と蛍光極大の 642 nm への長波長変化を示すことを明らかとしている。これに関しては、量子化学計算からも JS-R は Fru と複合体を形成することで HOMO-LUMO エネルギーギャップが減少する結果を得ており、蛍光極大の長波長変化をもたらした要因についての考察も行っている。また、中性条件下において JS-R の各種ポリオールに対する結合定数を比較し、JS-R が Fru に対して高い親和性を有すること、また別に、中性条件下で H₂O₂ を添加することにより吸収極大が 564 nm へ短波長変化を示すこと、564 nm での励起により JS-R の蛍光スペクトルを測定した際、H₂O₂ の添加により蛍光極大が 630 nm から 584 nm へ短波長変化すること、さらに JS-R においても Fru の有無による H₂O₂ 反応性について検討し、JS-R は Fru 非存在下、すなわち環状エステルを形成していない方が、H₂O₂ との反応が速やかであることを見出している。また別に、高分解能質量分析を用いて、H₂O₂ との反応生成物が JS-R のボリン酸残基がエーテル結合に置換された *O*-pyronine であることも明らかとしている。

第 3 章では、CyBA ならびに JS-R の特徴を基に、生体内分析への適用可能性に関する評価を行っている。悪性腫瘍患者ではシアル酸総量が増加しており、糖鎖の結合様式の変化が顕著に生じるため、シアル酸を認識する蛍光プローブは癌細胞検出に有用である可能性が考えられる。そこで本章では、これら 2 種の化合物ならびに、対照として既知の糖応答性蛍光性ボロン酸誘導体である 4-isoquinolineboronic acid を用いて糖選択性に関する検討を行い、CyBA が他の 2 種化合物に比較し Neu5Ac に対する選択性が高いことを明らかとし、さらにこの結果を発展させ、蛍光側に 660 nm の光を選択的に透過するバンドパスフィルターを用いることで、溶液中及び生体組織を模倣したゲル内で、CyBA と Neu5Ac との結合による明度の高い蛍光像を観察することに成功している。

また別に、これら化合物の H₂O₂ との反応特性を利用し、Glc とグルコースオキシダーゼ (GOx) の反応生成物である H₂O₂ を検知することで Glc 濃度を測定可能かについても検討を行っている。既に CyBA 及び JS-R の H₂O₂ との反応速度定数の比較から、ポリオールと環状エステルを形成していない JS-R の反応速度定数が高いことが示されていることから、ここでは JS-R を用いて検討を行い、その結果、JS-R は、GOx 共存下、Glc の添加により、H₂O₂ 添加時と同様の 630 nm から 584 nm への蛍光極大の短波長変化を示し、また 5.0 μM JS-R、10 μg/mL GOx の実験条件下では、その蛍光強度比 (584 nm/630 nm) が Glc 濃度 1 mM 以上で一定となることを明らかとしている。

以上、本論文では、近赤外領域に光学特性を有し、ホウ素をセンシング部位とする 2 種類の新規蛍光性センサー分子 CyBA ならびに JS-R の開発に成功している。今後は、CyBA に関しては細胞糖鎖に含まれる Neu5Ac 認識に基づいた *in vivo* 蛍光イメージングなどへの適用、JS-R に関しては H₂O₂ 検出に基づいた Glc 高感度検出系などへの応用といったポリオールや ROS の直接的な検出や酵素反応等を利用したバイオセンシングへの適用が期待できる。研究の意義に加えて、新規性および独創性、有用性の観点からも意義深く、本薬学研究科課程による博士 (薬学) の論文に十分値するものであると判断する。