

高選択及び高感度を目的とする蛍光・化学発光試薬の開発

中園 学

Development of Highly Selective and Sensitive Fluorescent and Chemiluminescent Reagents

Manabu NAKAZONO

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan

(Received February 9, 2008)

Fluorescence (FL), chemiluminescence (CL) and bioluminescence (BL) have been extensively focused on luminescence assays. Various FL and CL compounds have been synthesized and evaluated their FL and CL properties. This review describes development of highly selective and sensitive FL and CL reagents by derivatizing luminol, indole and polyphenol. Luminol derivatives were used for measuring enzyme activities and ultraviolet ray power. Indole derivatives with large Stokes shift and long-lasting CL properties were developed. Compound which had enhancement effect on polyphenol CL was found. Highly sensitive CL polyphenol dendrimers were synthesized.

Key words—chemiluminescence; fluorescence; luminol; indole; polyphenol; dendrimer

1. はじめに

近年、分析化学研究分野において蛍光 (Fluorescence)、化学発光 (Chemiluminescence) 及び生物発光 (Bioluminescence) による発光分析法は顕著な進歩を遂げている。¹⁻³⁾ 特に生体内物質の選択的計測を目的とする発光試薬の開発は世界中で活発に研究がなされ、⁴⁻⁶⁾ それは最新分析機器の高性能化及び新規な発光特性を有する分析試薬の開発の進歩とともにある。分子細胞生物学をはじめ生化学研究において発光試薬が果たす役割は増える一方である。しかし、汎用されている発光試薬は限られてきており、類似した研究が数多くみられ、発光試薬の選択性及び感度の低さが原因で研究が進まない例が見受けられる。そこで、さらなる発光分析法の適用を広げる観点から、新たな発光試薬の基礎研究が必要となっている。本総説では、筆者らが取り組んできたルミノール (Luminol)、インドール (Indole) 及びポリフェノール (Polyphenol) 化合物を基盤と

した高選択及び高感度を目的とする蛍光・化学発光試薬の開発を中心に紹介する。

2. ルミノール誘導体を用いる加水分解酵素活性測定法及び紫外線光強度測定法

ルミノールは、化学発光試薬の中でも非常に高感度な計測を可能とする化学発光試薬として古くから知られている。特に、血痕及び過酸化物の検出において汎用されている。ルミノールは、アルカリ存在下、過酸化水素及びフェリシアン化カリウムの酸化により青色 (420 nm) 発光する。ルミノールのカルボニル酸素に置換基を導入することで、非化学発光性 (off) のルミノール誘導体に導き得ることが見い出されていた。⁷⁾ On-off スwitching 発光特性に着目し、加水分解酵素である β -D-ガラクトシダーゼ (β -D-Gal) 及びアルカリホスファターゼ (ALP) 測定用の化学発光基質を合成し、高感度な酵素活性測定法を開発した (Fig. 1)。 β -D-Gal 測定法では、検量域 0.05–5 mU/tube, 検出下限 ($S/N=3$) 50 μ U/tube, ALP 測定法では、検量域 0.1–5 mU/tube, 検出下限 ($S/N=3$) 100 μ U/tube であり、従来の蛍光法と比較し高感度であった。⁸⁾ 蛍光化合物の on-off スwitching 発光特性に基づいた研究例は多いが、化学発光化合物の on-off スイ

九州大学大学院薬学研究院 (〒812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1)

e-mail: nakazono@phar.kyushu-u.ac.jp

本総説は、平成 19 年度日本薬学会九州支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

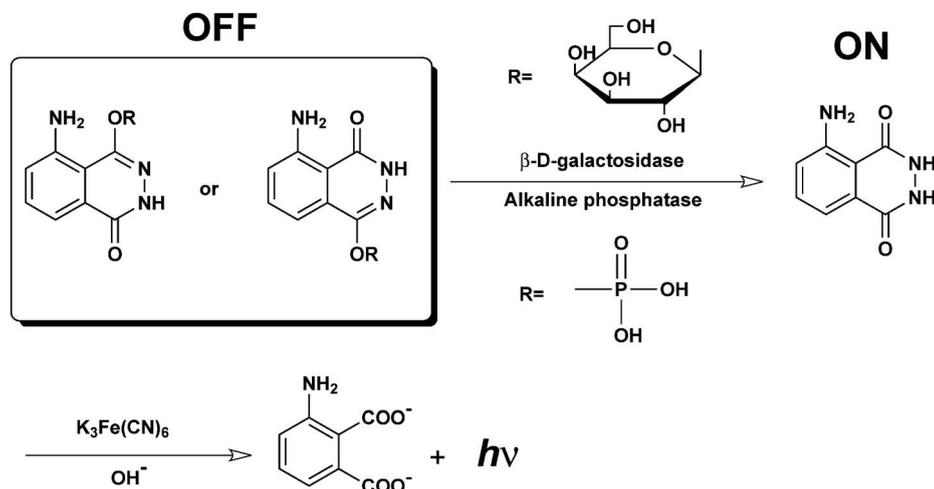


Fig. 1. Chemiluminescent Substrates for the Measurement of β -D-Galactosidase and Alkaline Phosphatase Activities Based on On-off Switching

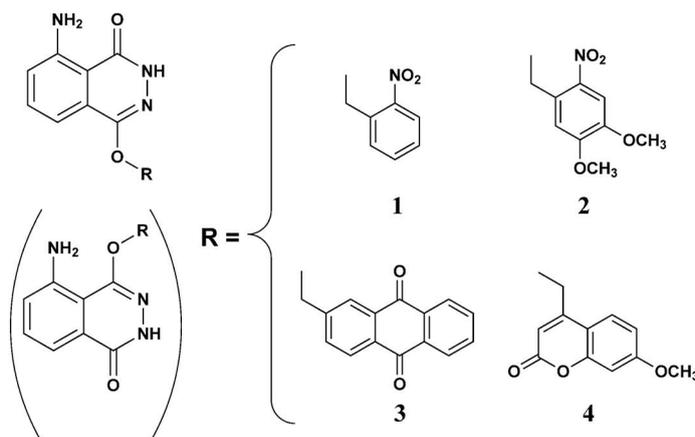


Fig. 2. Photosensitive Luminol Derivatives

チング発光特性に基づいた研究例は少ない。

一方、紫外線光強度測定が可能な発光プローブは開発されていなかった。そこで、紫外線に応答し化合物を放出することのできる光分解性保護基であるニトロベンジル、アントラキノン及びクマリンに着目した。ルミノールのカルボニル酸素に光分解性保護基を有した数種のルミノール誘導体 (1-4) を合成し、紫外線光強度測定に適用した (Fig. 2)。そのうち、Luminol-*O*-2-nitrobenzylate (1) が紫外線光強度測定に最も適していた。また、クマリンは他の光分解性保護基と比較して迅速な光応答性を有し優れていた。⁹⁻¹¹⁾

3. ストークスシフトが大きくかつ持続性化学発光を示すインドール誘導体の開発

インドールは蛍光・化学発光試薬として古くから

知られている。しかし、自然蛍光は強いものの蛍光極大波長が短く、化学発光強度が弱くて持続性がないなどの欠点を有していた。そこで筆者らは、蛍光極大波長が長く (500 nm 以上)、化学発光強度が強かつ持続性 (発光時間 10 分間以上) を有するインドール誘導体を開発することにした。インドールの 3 位に置換基を有する 20 種以上のインドール誘導体の化学発光を測定した結果から、3-Indoleglyoxylyl chloride (5) が持続性化学発光化合物であることを見出した (Fig. 3)。¹²⁾ 5 の化学発光反応においては、Indole-3-carboxylic acid が生成することを確認した。このことから、5 の化学発光メカニズムは、ジオキセタン及びジオキセタンジオンを経由したメカニズムではないかと推測した。

高選択性及び高感度発光分子を設計するに当たり、

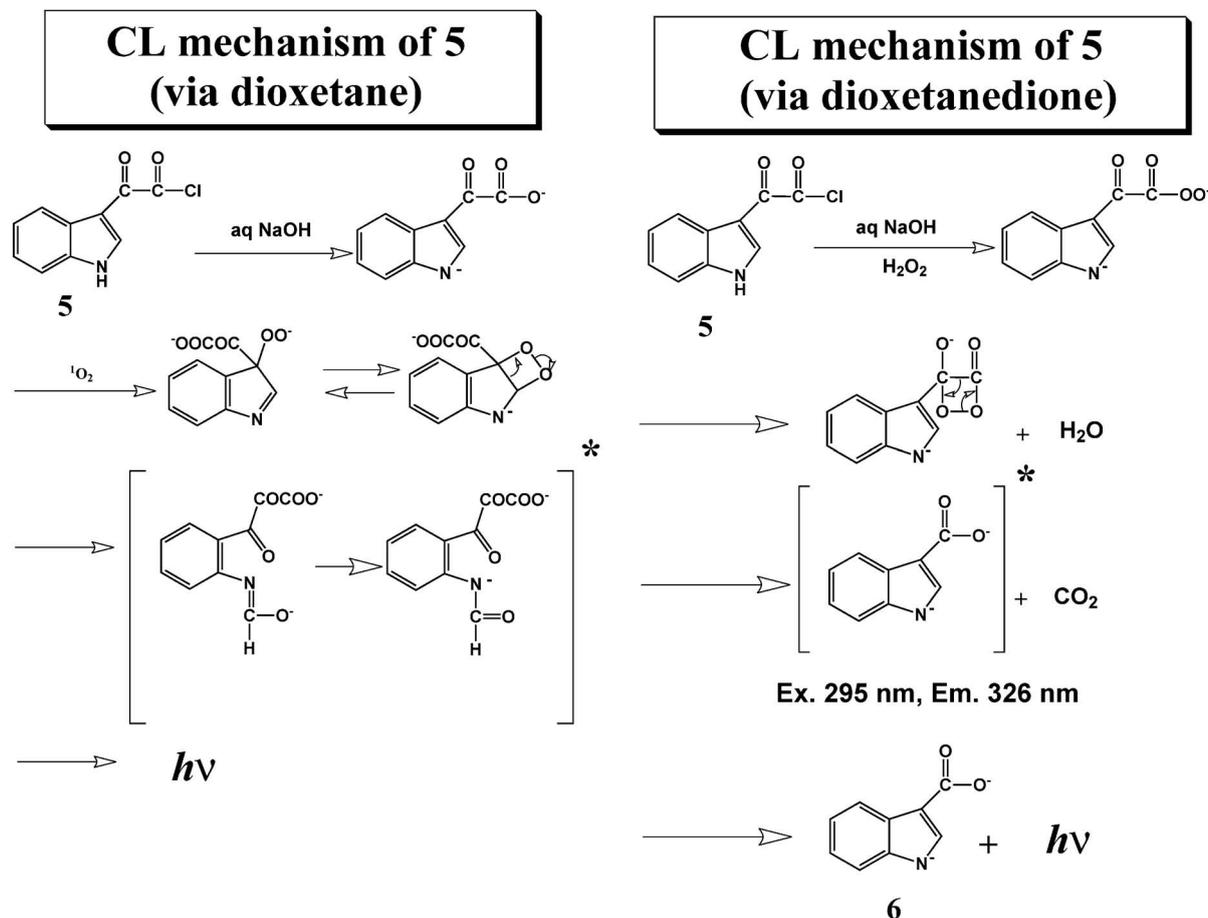


Fig. 3. Chemiluminescence Mechanism of 3-Indoleglyoxylyl Chloride *via* Dioxetane and Dioxetanedione

2つのコンセプトを設けた。1つは π -共役による蛍光波長の長波長側へのシフトを引き起こすこと、もう1つはインドール部位以外にもジオキセタン化学発光が可能なインドール誘導体とすることであり、これにより発光強度の増加を期待した。このコンセプトに合致したのは、構造内に2つのインドールがマレイミドによって連結されたビスインドリルマレイミド (Bisindolylmale imide, BIM) であった [Fig. 4(a)]. 20種以上の BIM 誘導体を合成し、その発光を測定した結果から、蛍光極大波長が 500 nm 以上と長く、200 nm 以上のストークスシフトを有してかつ、10 分以上化学発光が持続する BIM 誘導体を見い出した。また、可視部における様々な蛍光発光色を有する BIM も開発し、^{13,14} BIM が一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) により強く発光すること及び BIM の化学発光のメカニズムを推測した [Fig. 4(b)].¹⁵

次に、量子化学計算を取り入れて、BIM の蛍光発光特性を評価した。その結果、吸収極大波長の実

測値と *ab initio* 分子軌道構造相関 (MOCI) 法から計算された推定値が非常に近似した。したがって、この結果から、BIM は励起状態でイオン化していることが見い出された。

4. ポリフェノール化学発光の増感及び化学発光性ポリフェノール誘導体の開発

ポリフェノールの化学発光種は $^1\text{O}_2$ であり、その発光波長は約 630 nm である。¹⁶ ポリフェノールは、化学発光性を有しているが化学発光強度は低く、ポリフェノールの高感度測定法及び高感度化学発光性ポリフェノールの開発はあまりなされていなかった。そこで、数種のカルボジイミド存在下、ポリフェノールの化学発光を測定したところ、水溶性カルボジイミドである 1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide がポリフェノールの化学発光強度を数百倍増加させることを見い出した。¹⁷ この化学発光増感効果を利用して、ポリフェノールのフローインジェクション測定法及び HPLC-化学発光測定法を開発した。^{18,19}

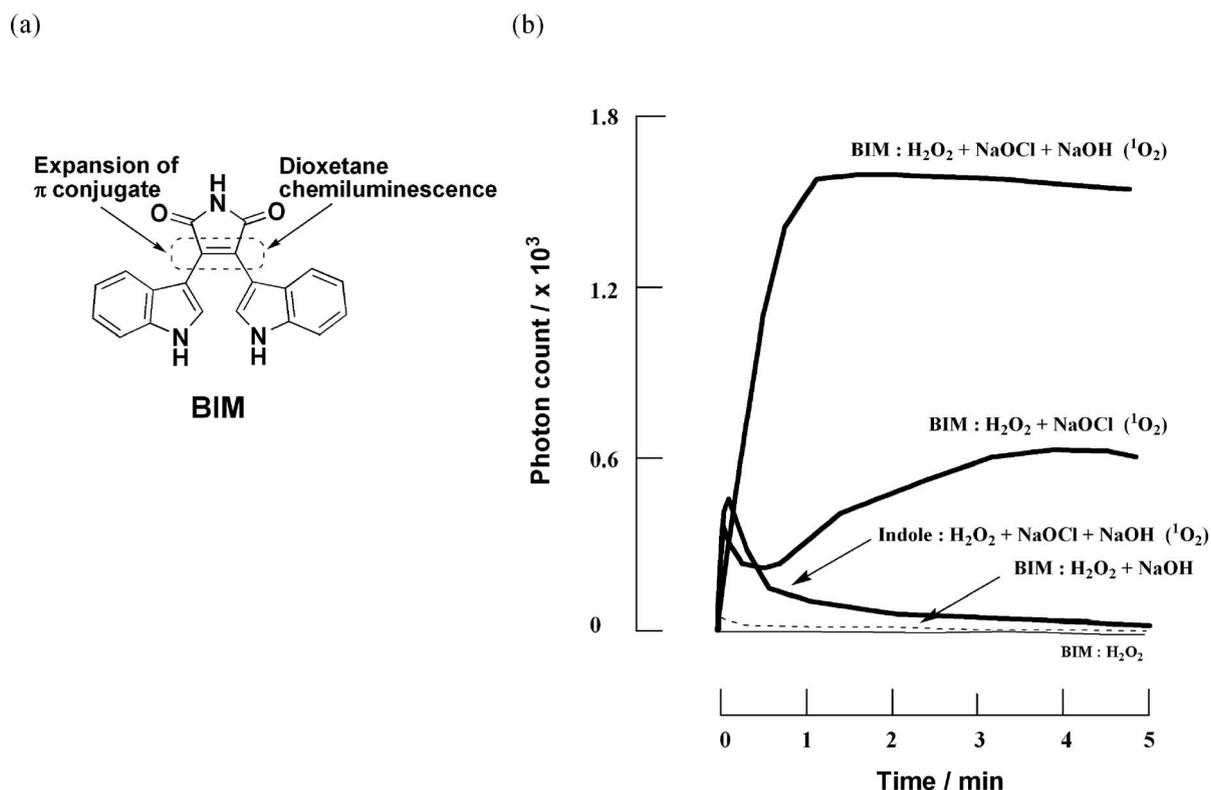


Fig. 4. (a) Bisindolylmaleimide (BIM) with Expansion of π -Conjugate and Dioxetane Chemiluminescence, (b) Chemiluminescence of BIM in the Presence of Singlet Oxygen and Hydrogen Peroxide

次に、超分子化学を取り入れて、高感度化学発光性ポリフェノールを開発した。発光体ユニットの増加に伴う化学発光強度の増加を予測して、環状フェノールであるカリックスアレーン (Calixarene) 及び樹木状高分子である dendrimer (Dendrimer) に着目した。Trihydroxyphenol linked-calix [4] arene 及びポリフェノール dendrimer を合成し、没食子酸 (Gallic acid) の化学発光強度の数百倍の高感度化を達成した (7-9, Fig. 5).^{20,21)} 中でも、ポリフェノール dendrimer の化学発光は持続性を有していた。量子化学計算に基づいて、ポリフェノール dendrimer 構造の最適化も行った。また、界面活性剤存在下、ポリフェノール dendrimer の化学発光強度が増加することも見出した。²²⁾ ポリフェノールの抗酸化能評価の研究例は多いが、このようなポリフェノール発光試薬の開発例は少ない。

5. まとめ

高選択及び高感度化を目的として、ルミノール、インドール及びポリフェノールなどの蛍光・化学発光試薬の合成及びその発光特性の評価を中心に研究を展開してきた。これらの研究の取り組みの中で、

光化学及び超分子化学を発光試薬の開発に取り入れてきた。また、大型計算機による量子化学計算が可能となった現在では、発光メカニズムの解明を始めとして、理論的発光試薬の設計にも取り組んでいる。将来的には、分析対象化合物に最適な発光試薬の設計・合成が可能となることを期待している。また、化学発光試薬は、微量の過氧化物と反応し検出できることから抗酸化能を有した医薬品のシーズとしても興味深く、その動態及び代謝研究においても発光研究が十分役立つと考えられる。このように発光試薬の研究開発は、物理系薬学領域の分析化学研究において今後益々発展が望まれる研究である。

謝辞 本研究はすべて、九州大学大学院薬学研究院生体分析化学分野研究室で行われました。財津潔教授、大倉洋甫名誉教授、能田均教授、甲斐雅亮教授並びに大庭義史教授の御指導に深く感謝いたします。研究に御協力頂きました研究室の学生の皆様に心から感謝いたします。量子化学計算に御協力頂きました分子科学研究所に感謝いたします。本研究の一部は日本学術振興会科学研究費補助金 (基盤

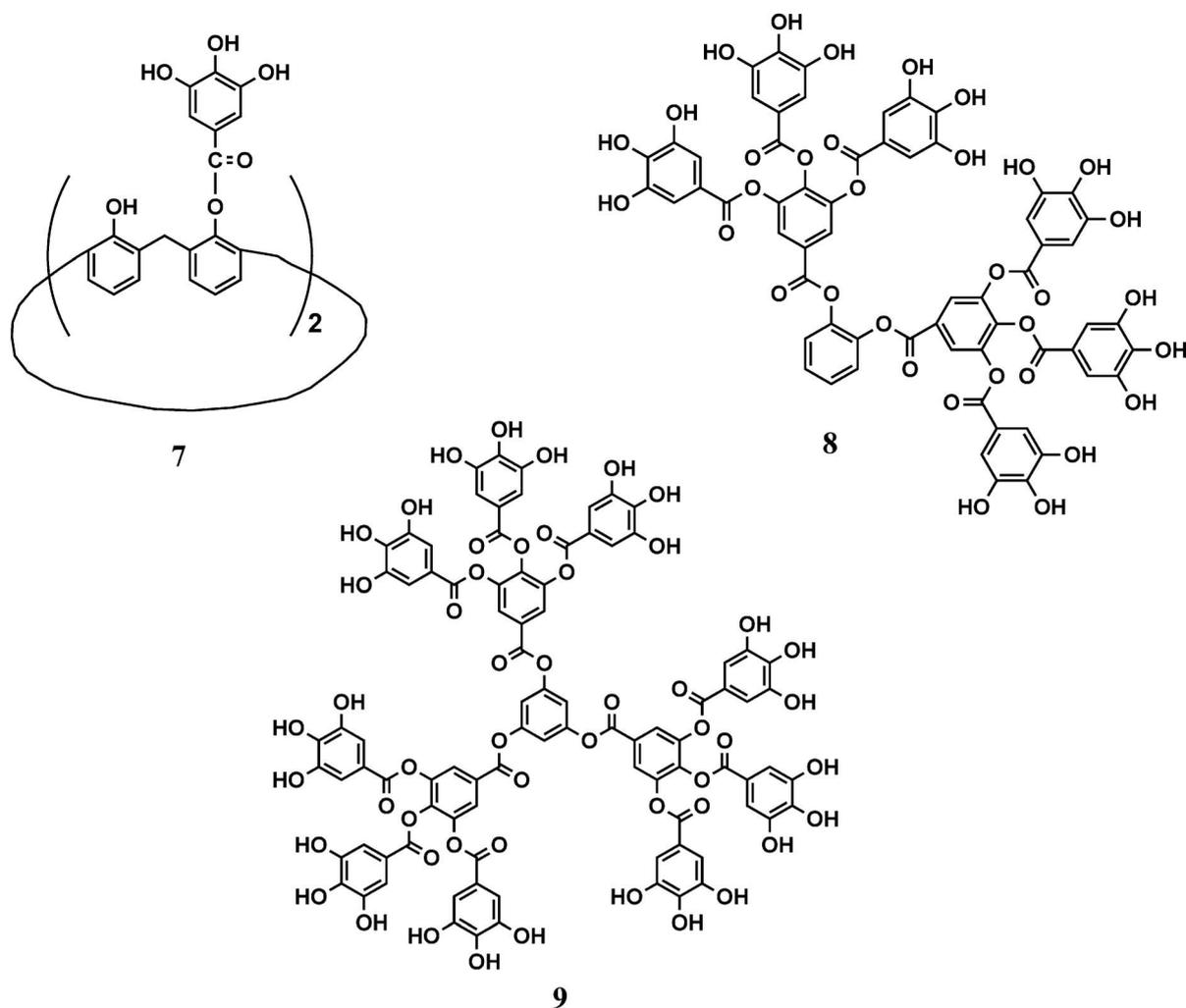


Fig. 5. Trihydroxyphenol Linked-calix[4]arene and Polyphenol Dendrimer with Catechol and 3,4,5-Trihydroxybenzene as Core Molecules

研究 C) の助成の下に行われました。

REFERENCES

- 1) Sapsford K. E., Berit L., Medintz I. L., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 4562–4588 (2006).
- 2) Kricka L. J., *Anal. Chem.*, **71**, 305R–308R (1999).
- 3) Shimomura O., “Bioluminescence,” World Scientific Publishing Co., Pte., Ltd., Singapore, 2006.
- 4) Sasaki E., Kojima H., Nishimatsu H., Urano Y., Kikuchi K., Hirata Y., Nagano T., *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 3684–3685 (2005).
- 5) Lee D., Khaja S., Velasquez-Castano J. C., Dasari M., Sun C., Petros J., Taylor W. R., Murthy N., *Nat. Mater.*, **6**, 765–769 (2007).
- 6) Kogure T., Karasawa S., Araki T., Saito K., Kinjo M., Miyawaki A., *Nat. Biotechnol.*, **24**, 577–581 (2006).
- 7) White E. H., Roswell D. F., *Acc. Chem. Res.*, **3**, 54–62 (1970).
- 8) Nakazono M., Nohta H., Sasamoto K., Ohkura Y., *Anal. Sci.*, **8**, 779–783 (1992).
- 9) Nakazono M., Asechi M., Zaitso K., *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **163**, 149–152 (2004).
- 10) Nakazono M., Zaitso K., “Biolumi. Chemilumi., Prog. Persp.,” 2005, pp. 179–182.
- 11) Nakazono M., Hino T., Zaitso K., *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **186**, 99–105 (2007).
- 12) Nakazono M., ShoY., Zaitso K., *Anal. Sci.*, **19**, 123–127 (2003).
- 13) Nakazono M., Asechi M., Zaitso K., “Biolumi. Chemilumi. Prog. Persp.,” 2005, pp. 175–178.

- 14) Nakazono M., Nanbu S., Uesaki A., Kuwano R., Kashiwabara M., Zaitzu K., *Org. Lett.*, **9**, 3683–3686 (2007).
- 15) Nakazono M., Uesaki A., Zaitzu K., *Talanta*, **70**, 128–132 (2006).
- 16) Slawinska D., Slawinski J., *Anal. Chem.*, **47**, 2101–2109 (1975).
- 17) Nakazono M., Ijichi J., Ohba Y., Zaitzu K., *Anal. Sci.*, **14**, 853–854 (1998).
- 18) Ohba Y., Yamashita M., Nakazono M., Ma L., Zaitzu K., *Anal. Sci.*, **16**, 979–980 (2000).
- 19) Ma L., Ohba Y., Nakazono M., Zaitzu K., *Anal. Sci.*, **18**, 1163–1165 (2002).
- 20) Nakazono M., Ohba Y., Zaitzu K., *Chem. Pharm. Bull.*, **47**, 569–570 (1999).
- 21) Nakazono M., Ma L., Zaitzu K., *Tetrahedron Lett.*, **43**, 8185–8189 (2002).
- 22) Nakazono M., Yamasaki N., Ma L., Zaitzu K., *Luminescence*, **18**, 239–242 (2003).