

ピレンを骨格とする高性能蛍光色素並びにピレンの蛍光スイッチングを利用した高感度蛍光センサ分子

藤本和久

Highly Emissive Pyrene-based Fluorophores and Highly Sensitive Fluorescent Sensors Using Pyrene Emission Switching

Kazuhisa FUJIMOTO

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Toyama,
Sugitani 2630, Toyama 930-0194, Japan

(Received May 31, 2010)

In this review, I report highly emissive pyrene-based fluorophores and highly sensitive fluorescent sensors using pyrene emission switching. Alkynylpyrene derivatives show fruitful photophysical properties, as compared with pyrene itself: longer absorption and emission wavelengths and high fluorescence quantum yields in the presence of O₂. Alkynylpyrene-based fluorescent probes allow the highly sensitive detection of biomolecules such as proteins. Additionally, a rotaxane-based fluorophore, consisting of an alkynylpyrene derivative and two cyclodextrins, is highly stable upon irradiation with a UV/vis illuminator. On the other hand, I and my colleagues have developed a variety of fluorescent sensors using pyrene emission switching. One of them is DNA probes in which two pyrenes are connected both at 3' and 5' ends of a single-stranded oligonucleotide. Emission switching occurs from excimer to monomer when the probes hybridized with target DNAs. The DNA probes met antibody structures to produce the following fluorescent sensors. The sensors consist of three functional regions, crown ether (or cyclodextrin), DNA, and pyrene as guest-binding, dimerizing, and sensing sites, respectively. These sensors can detect potassium cation, porphyrin, unsaturated fatty acid by pyrene monomer-excimer switching.

Key words—pyrene; alkynylpyrene; fluorophore; pyrene emission switching; fluorescent sensor

1. はじめに

代表的な蛍光色素の1つであるピレンは、希薄溶液においてはモノマー発光を、濃厚溶液においては二分子が近接し励起錯体を形成することでエキシマー発光を示す。¹⁾ この特徴的な性質を利用することで、各種センサ分子の開発やDNA、タンパク質、細胞膜といった生体分子の位置・空間情報を得るための研究が数多く行われてきた。²⁻⁵⁾ 本総説においては、筆者がこれまでに開発したピレンを骨格とする優れた光物性を示す蛍光色素、並びにピレンのエキシマー発光とモノマー発光のスイッチングを利用した蛍光センサ分子に関する研究成果を紹介する。

2. 高蛍光量子収率かつ酸素による消光を受け難い蛍光色素：アルキニルピレン

ピレンは、化学修飾のし易さ、エキシマー発光を示すといった性質から、化学・生化学分野において重用されてきた。しかしながら、励起波長(350 nm)が比較的短波長、感度が悪い(蛍光量子収率が低い)、酸素による消光が著しいといった問題点がある。筆者らによるピレンに関する光化学・超分子化学の研究の過程で、⁶⁾ 上記の欠点を克服するには、種々のアルキニル基をピレン核に導入すればよいことがわかった(アルキニルピレン骨格)。⁷⁾ ピレン**1**並びに合成したアルキニルピレン誘導体**2-6**の構造式とその吸収波長、モル吸光係数、発光波長はFig. 1(a)の通りである。ピレン**1**の吸収波長、発光波長に比べて、アルキニルピレン誘導体は吸収波長において最大で100 nm、発光波長において65 nmの長波長シフトを示した(励起波長の問題の解決)。また高濃度溶液においては、ピレンの特徴的

富山大学大学院医学薬学研究部(薬学)(〒930-0194
富山市杉谷2630)

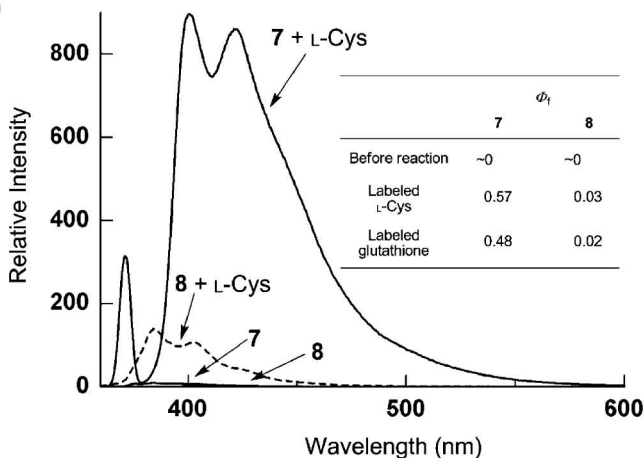
e-mail: fujimoto@pha.u-toyama.ac.jp

本総説は、平成21年度日本薬学会北陸支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

(a)

Pyrene and Alkynylpyrenes	Absorption ^a		Emission ^a (Monomer)		Emission ^a (Excimer)
	Wavelength (nm)	ϵ ($\times 10^4$) (mol ⁻¹ dm ³ cm ⁻¹)	Wavelength (nm)	ϕ_f	Wavelength (nm)
1: R ¹ = R ² = R ³ = R ⁴ = H	334	4.63	373	0.32 (0.019) ^b	475
2: R ¹ = C≡CSiMe ₃ , R ² = R ³ = R ⁴ = H	365	5.77	386	0.55	505
3: R ¹ = R ² = C≡CSiMe ₃ , R ³ = R ⁴ = H	390	9.22	399	0.67	523
4: R ¹ = R ² = R ³ = C≡CSiMe ₃ , R ⁴ = H	413	10.0	421	0.80	545
5: R ¹ = R ² = R ³ = R ⁴ = C≡CSiMe ₃	434	13.2	438	>0.99	568
6: R ¹ = C≡CPh, R ² = R ³ = R ⁴ = H	382	4.47	391	0.78 (0.56) ^b	509

(b)



(c)

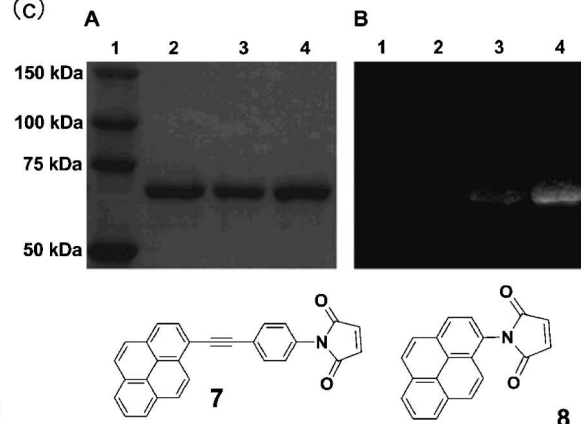


Fig. 1. Alkynylpyrenes

(a) Chemical structures and photophysical properties of pyrene **1** and alkynylpyrenes **2–6**; ^aall data were obtained in EtOH, ^bthe values in parentheses were obtained in the presence of O₂. (b) Fluorescence spectra of **7** and **8** before and after the labeling reaction with L-cysteine in 0.07 M phosphate buffer solutions and the ϕ_f values of **7** and **8** before and after the labeling reactions. (c) SDS-PAGE photographs of BSA and its adducts. Photographs (A) and (B) were visualized by Coomassie blue staining and by irradiation with a UV/vis illuminator, respectively; lane 1: molecular weight markers, lane 2: BSA, lane 3: BSA labeled with **8**, lane 4: BSA labeled with **7**.

な性質であるエキシマー発光を示すこともわかった。酸素存在下でのピレンの蛍光量子収率が0.32であるのに対して、同条件下でのアルキニルピレンのそれは0.5以上であり、最も高いものにおいてはほぼ1であった(感度の問題の解決)。一方、ピレンの酸素存在下における蛍光量子収率は0.019まで下がるのに対して、アルキニルピレン誘導体の場合、酸素の影響をほとんど受けないことがわかった。例えば**6**は酸素存在下でも高い蛍光量子収率(0.56)を示した(酸素による消光の解決)。実際、生体分子の蛍光検出においては、酸素存在下での実験を避けることができない。それゆえ、アルキニルピレン骨格が示す酸素存在下での高い蛍光量子収率は、高感度な生体分子プローブへの可能性を約束する。この優れた光物性を生体分子の蛍光観察に応用するために、アルキニルピレン骨格を化学修飾し、いくつかの蛍光ラベル化剤を開発した。アルキニル

ピレン誘導体**6**は、アルキニル基に連結したベンゼン環が存在するので、これを化学修飾することで多彩な蛍光ラベル化剤へと誘導できる。一例として、**6**にマレイミド基を導入した蛍光ラベル化剤**7**を紹介する[Fig. 1(c)]。マレイミド基はチオール基と選択的に反応するので、タンパク中のシステイン残基のラベル化に利用されている。**7**の参照分子として、市販のピレンマレイミド**8**を用いた。まず、システインやシステインを含むグルタチオンを**7**でラベル化し、ラベル化前後における蛍光特性を評価した。ラベル化反応前において、**7**と**8**そのものの蛍光スペクトルを確認することができず、蛍光量子収率はともにほぼ0であった[Fig. 1(b)]。この消光の原因はマレイミド基からの光誘起電子移動(photoinduced electron transfer: PET)によるものであることが確認された。ラベル化反応後、**8**でラベル化されたシステインやグルタチオンの蛍光量子

収率は 0.03, 0.02, 一方 7 でラベル化されたそれぞれの蛍光量子収率は 0.57, 0.48 であった. 7 でラベル化されたものの蛍光量子収率は, 8 の場合と比べて約 20 倍であった. 蛍光ラベル化剤 7 を用いることで, 蛍光のオン/オフスイッチングによりラベル化反応の成否を判断することができ, かつ高感度で生体分子を検出できることが判明した. Fig. 1 (c) は, 複数のシステイン残基を含むタンパクであるウシ血清アルブミン (BSA) を 7 と 8 でラベル化した後のゲル電気泳動写真である. 左側が Coomassie Blue で染色したもので, 右側が光照射下において蛍光を観察したものである. 右側の蛍光写真において, 7 でラベル化したレーン 4 においてのみはっきりと BSA 由来のバンドを確認することができた. 以上の結果より, アルキニルピレンを骨格とする 7 は, タンパク質のラベル化において有用な蛍光ラベル化剤であることがわかった.

筆者らは, アルキニルピレン骨格の光材料としての可能性を調べるために, アルキニルピレンを骨格とするオリゴマー分子や四置換アルキニルピレン誘導体を合成し, その光物性を詳細に調べた.^{8,9)} アルキニルピレン骨格をオリゴマー化させると, π 電子の共役が延びるにつれて, 吸収・発光波長ともに大きく長波長側にシフトすることが明らかとなった. 四置換アルキニルピレン誘導体においては, アセチレンの末端にアニリン誘導体が連結されていると蛍光ソルバトクロミズムを示すことがわかった. これらの結果は, アルキニルピレン骨格の光材料としての可能性を示唆するものである.

最近, アルキニルピレン骨格をシクロデキストリンで包接しロタキサン型とした光褪色し難い青色発光色素 9 を開発した (Fig. 2).¹⁰⁾ 蛍光色素に対して長時間励起光を照射し続けると, 徐々にその発光強度が小さくなり褪色してしまう. 光褪色は, 励起光を吸収し励起状態になった色素に活性酸素等が反応することで非蛍光性分子になってしまう現象である. この光褪色を抑制することができれば, 蛍光ラベル化した生体分子の挙動を長時間観測したり, 一分子蛍光観測に応用することができる. さらに材料科学の分野において安定な発光を維持する色素は, 次世代の発光素材としての応用が期待される. 例えば, レーザーを光源とするディスプレイを開発するためにはこのような色素の存在が必要不可欠であ

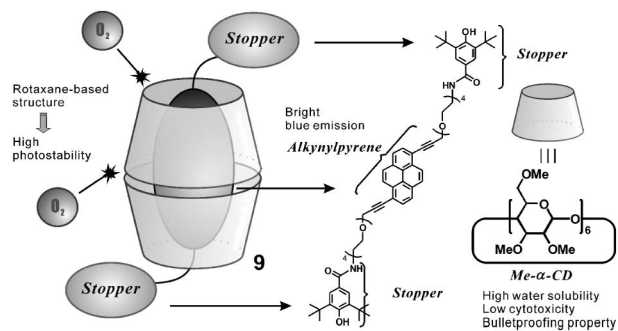


Fig. 2. A Rotaxane-based Fluorophore Consisting of an Alkynylpyrene and Two Cyclodextrins as Rod and Ring Moieties, Respectively

る. ロタキサン骨格のシクロデキストリン部位は, 発光部位であるアルキニルピレンを包接しバルクから隔離することで, 活性酸素等の攻撃から守る, いわゆる防弾ガラス的役割を果たしている. また, 紫外光, 可視光領域においてほとんど光を吸収しないことから, 包接する色素に対して電子的影響を与える心配がない. 合成したロタキサン型発光色素とシクロデキストリン部位を持たないダンベル型参照分子の各水溶液に対して, UV ランプで長時間照射したところ, ダンベル型参照分子はそのほとんどが非蛍光性分子になってしまったのに対し, ロタキサン型蛍光色素においてはほとんど変化がみられなかった. 現在, 405 nm の青色ダイオードレーザーで励起可能なロタキサン型発光色素を合成中である.

3. ピレンのエキシマー発光とモノマー発光のスイッチングを利用したセンサ分子

筆者らは, アルキニルピレン誘導体の開発と平行してピレンのエキシマー発光とモノマー発光のスイッチングを利用した水溶性センサ分子の開発を行ってきた. 一番最初に開発したのが, DNA 検出プローブ分子である (Fig. 3).¹¹⁾ 代表的な DNA 検出プローブ分子であるモлекуラービーコン¹²⁾の骨格として利用されているヘアピンループ構造 DNA の両末端に 2 枚のピレンを導入したもので, エキシマー発光とモノマー発光のスイッチングによってターゲット DNA 鎖を検出できる. ループ領域に対する相補鎖が不在時にはステム構造が保持されているためエキシマー発光が, ループ領域と相補鎖が二重鎖を形成しステム構造が解離することでモノマー発光が検出される仕組みである. 開発したプローブ分子は, その濃度が 10^{-8} M という低濃度において

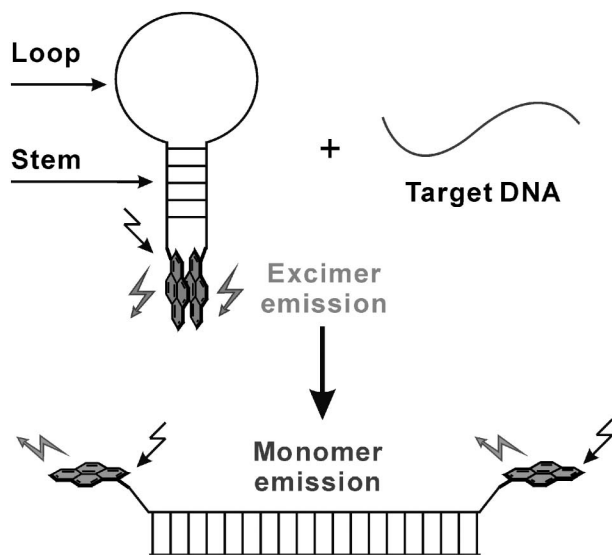


Fig. 3. Schematic Representation of DNA Probes Using Pyrene Excimer-monomer Switching

In the absence of target DNAs, the stem-close-shaped probes predominantly emit the excimer fluorescence. Upon hybridization with target DNAs, the probes undergo the dynamic conformational change to emit the monomer fluorescence.

もターゲット鎖を検出できる。

この DNA 検出プローブ分子の骨格と抗体の構造を照らし合わせ開発に至ったのが以下に紹介するセンサ分子群である。先ほどの DNA 検出プローブ分子の骨格からループ領域を除去し、標的ゲスト分子を捕捉できる部位を導入することで、ピレンの発光スイッチングによってゲスト分子を検出できる抗体様のセンサ分子を構築できると考えた [Fig. 4 (a)]. ゲスト分子不在時には、DNA 部分が二重鎖を形成しておらずピレンのモノマー発光が観測される。ゲスト分子を加えるとゲスト分子認識部位との間で会合体形成が生じ、それを駆動力として DNA 二重鎖形成が起こり、結果ピレンエキシマー発光へのスイッチングが起こる。この分子設計を基にまず開発したのが、カリウムカチオンに対するセンサ分子である [Fig. 4 (b)].¹³⁾ ゲスト分子認識部位として、カリウムカチオンと 1:2 の化学量論比でサンドイッチ型の会合体を形成することが知られているベンゾ 15-クラウン-5 エーテルを用いた。カリウムカチオンを加えるとピレンのモノマー発光からエキシマー発光へのスイッチングが観測された。カリウムカチオンの添加によって DNA 二重鎖形成の融解温度 (T_m) が上昇することから、カリウムカチオンとベンゾ 15-クラウン-5 エーテルとの会合が

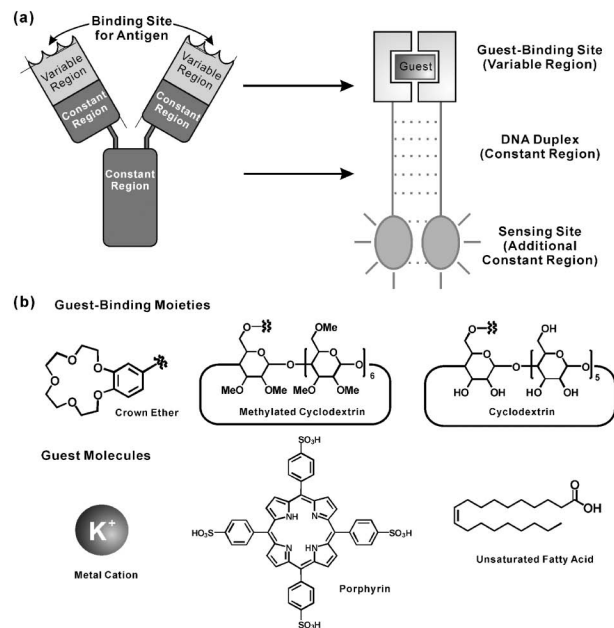


Fig. 4. DNA Duplex-based Fluorescent Sensors

(a) The structural motif of antibodies and the molecular design for duplex-based, fluorescent sensors working in water. (b) Chemical structures of the guest-binding moieties and their corresponding guest molecules.

DNA 二重鎖形成を促進していることが明らかとなった。また、このセンサ分子はナトリウムカチオンに対してカリウムカチオンを選択的に検出することもわかった。この分子設計の一般性を示すために、ゲスト分子認識部位としてメチル化シクロデキストリンを導入したセンサ分子を合成した [Fig. 4 (b)].¹⁴⁾ メチル化 β -シクロデキストリンは、2:1 の錯形成比でポルフィリン誘導体と強く会合することが知られている。このセンサ分子の水溶液にポルフィリン誘導体を加えると、カリウムカチオンセンサの時と同様にピレンの発光スイッチング、並びに T_m の上昇が観測された。

最近、センサ分子の合成を簡略化するためにクリック反応を利用して α -、並びに β -シクロデキストリンを導入したセンサ分子を合成した [Fig. 4 (b)].¹⁵⁾ シクロデキストリンのアジ化物と DNA 上に導入したアセチレンとの間でクリック反応を行う。ゲスト分子としてステアリン酸・オレイン酸・エライジン酸・アラキドン酸といった各種脂肪酸を用いた。 β -シクロデキストリンで修飾したセンサ分子において、ステアリン酸を除く不飽和脂肪酸に対して蛍光のスイッチングが観測された。空孔サイズの小さい α -シクロデキストリンを導入したセンサ

分子を用いて、これらの不飽和脂肪酸を加えたところオレイン酸において最も大きな蛍光スイッチングが観測された。この選択性は、空孔サイズが小さくなったことで不飽和脂肪酸の二重結合の数や立体配置の違いが会合に反映され生じたものであると考えられる。この結果は、不飽和脂肪酸を蛍光で選択的に検出した初めての例である。筆者らが考案した分子設計を用いることで、抗体のような多様性を持った DNA 二重鎖を骨格とする蛍光センサ分子群の構築が可能となる。

4. おわりに

本総説で紹介した研究成果は、ピレンという発光色素の新たな可能性を示す。特に、ロタキサン型の発光色素はこれまでの発光素材にない特徴を有しているので、生体分子の一分子蛍光観測への利用や次世代ディスプレイ開発につながる発光素材への応用が期待される。

謝辞 これら研究成果は、筆者が在籍する富山大学大学院医学薬学研究部（薬学）薬化学研究室（井上将彦教授主宰）の多大なサポートのもとに得られたものである。アルキニルピレン誘導体の蛍光量子収率測定は、大阪府立大学大学院工学研究科の水野一彦教授と金沢大学理工学域物質化学類の前多肇准教授の協力で行われた。最後に井上将彦教授を始め協力を賜った方々に感謝する。

REFERENCES

- 1) Winnik F. M., *Chem. Rev.*, **93**, 587–614 (1993).
- 2) Saito Y., Okamoto A., Saito I., *Bioindustry*, **23**, 56–62 (2006).
- 3) Zama M., Bryan P. N., Harrington R. E., Olins A. L., Olins D. E., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **42**, 31–41 (1978).
- 4) Lehrer S. S., “Subcellular Biochemistry, Vol. 24, Proteins: Structure, Function, and Engineering,” eds. by Biswas B. B., Roy S., Plenum Press, New York, 1995, pp. 115–132.
- 5) Wieb van der Meew B., “Subcellular Biochemistry, Vol. 13, Fluorescence Studies on Biological Membranes,” ed. by Hilderson H. J., Plenum Press, New York, 1988, pp. 1–53.
- 6) Inouye M., Fujimoto K., Furusyo M., Nakazumi H., *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 1452–1458 (1999).
- 7) Maeda H., Maeda T., Mizuno K., Fujimoto K., Shimizu H., Inouye M., *Chem. Eur. J.*, **12**, 824–831 (2006).
- 8) Shimizu H., Fujimoto K., Furusyo M., Maeda H., Nanai Y., Mizuno K., Inouye M., *J. Org. Chem.*, **72**, 1530–1533 (2007).
- 9) Fujimoto K., Shimizu H., Furusyo M., Akiyama S., Ishida M., Furukawa U., Yokoo T., Inouye M., *Tetrahedron*, **65**, 9357–9361 (2009).
- 10) Fujimoto K., Yonenaga Y., Inouye M., unpublished data.
- 11) Fujimoto K., Shimizu H., Inouye M., *J. Org. Chem.*, **69**, 3271–3275 (2004).
- 12) Tyagi S., Kramer F. R., *Nat. Biotechnol.*, **14**, 303–308 (1996).
- 13) Fujimoto K., Muto Y., Inouye M., *Chem. Commun.*, 4780–4782 (2005).
- 14) Fujimoto K., Muto Y., Inouye M., *Bioconjugate Chem.*, **19**, 1132–1134 (2008).
- 15) Fujimoto K., Yamada S., Inouye M., *Chem. Commun.*, 7164–7166 (2009).