

# 緑色蛍光タンパク質 (GFP) クロモホアをモデルとした 新規蛍光分子の開発



技術解説

池尻昌宏\*, 宮下和之\*\*

Development of the novel fluorescent molecules based on the green fluorescent protein (GFP) chromophore

Key Words : Green fluorescent protein, GFP chromophore, fluorescent molecule, 4-diarylmethyleneimidazolinone

## 1. はじめに

緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein, 以下 GFP) は、1962 年に下村脩博士により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、現在、生命科学領域においては、生命現象の可視化ツールとして必要不可欠な存在となっており<sup>1)</sup>、その重要性は、2008 年、下村博士がノーベル化学賞を受賞したことからも明らかである。

発光の本体である GFP クロモホアは、タンパク質中の Ser65、Tyr66、Gly67 が環化、脱水、酸化されて *p*-hydroxybenzylideneimidazolinone 構造を形成している (図 1)。GFP クロモホアの化学的研究は生命科学領域での応用研究に比べると遅れていたが、そのモデル化合物は、これまでの蛍光分子にはみられない蛍光特性を示すことが知られており、近年、その特異な構造と蛍光特性から、本クロモホア構造を基にした新規蛍光分子の開発研究が数多く報

告されるようになってきた<sup>2)</sup>。

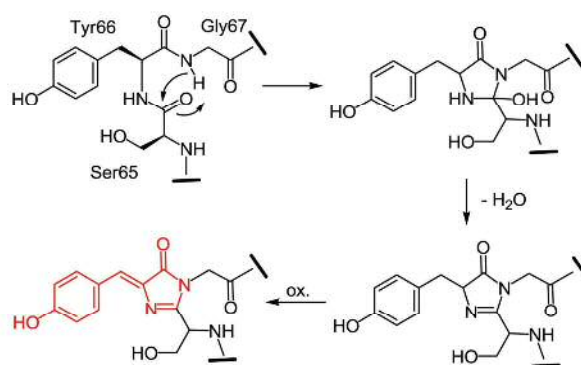


図1 GFP クロモホア (赤色部分) の生合成

これまで様々な要因により蛍光スイッチ (ON/OFF) が機能する蛍光分子が開発され、イメージングや蛍光性センサーとしての応用が報告されている。本稿では、筆者らの独自の発想に基づく新規 GFP クロモホアモデル化合物、diarylmethyleneimidazolinone (DAIN) 類の開発研究について概説する。

## 2. GFP クロモホアモデル化合物 (DAIN) の設計

GFP 中の GFP クロモホア構造は、バレル構造中の疎水的な環境に存在しており、*p*-ヒドロキシフェニル基は、その水酸基とタンパク質中の His148、Thr203 および Ser205 残基との水素結合によってベンジリデン基は *Z*-配置に固定されている。GFP クロモホア構造をバレル構造から取り出した場合、すなわちモデル化合物においては、紫外線を照射するとベンジリデン基は *Z*-配置から *E*-配置に異性化し、*Z*-体においては蛍光能が高いのに対して *E*-体においては、蛍光能は著しく減弱することが知られている。また *E*-体は、可視光照射あるいは熱により *Z*-体へと変換され、光照射による構造変換サイクルが形成されることも知られている (図 2)。

\* Masahiro IKEJIRI



1974年6月生  
大阪大学大学院 薬学研究科 応用医療薬科学専攻 (2003年)  
現在、大阪大谷大学 薬学部 薬学科 有機化学講座 准教授 博士 (薬学) 有機化学  
TEL : 0721-24-9653  
E-mail : ikejim@osaka-ohtani.ac.jp

\*\* Kazuyuki MIYASHITA



1957年3月生  
大阪大学大学院 薬学研究科 薬品化学専攻博士後期課程退学 (1983年)  
現在、大阪大谷大学 薬学部 薬学科 有機化学講座 教授 薬学博士 有機化学  
TEL : 0721-24-9652  
E-mail : miyasik@osaka-ohtani.ac.jp

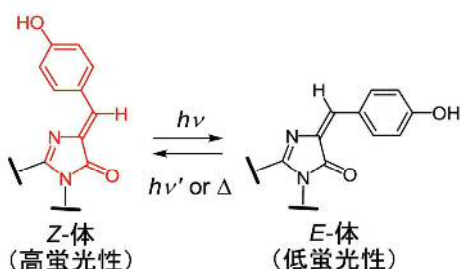


図2 GFPクロモホア構造の光変換サイクル

もう一つのモデル化合物の蛍光特性として、溶液状態では蛍光を示さないのに対して、結晶状態あるいは溶液の低温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、紫外線照射により励起状態へと導いたとき、溶液状態においてはベンジリデン構造部分の回転によりエネルギーを消費して無放射で基底状態へと戻るのに対して、結晶、低温凍結状態あるいは会合状態においてはコンホメーションが固定され、ベンジリデン構造が回転できなくなるため蛍光を発すると考えられている。

このような背景から、図3に代表的な例を示したが、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て、フェニル基の代わりに含窒素複素環を導入し窒素を配位原子として金属とキレートを形成することにより(化合物1, 2, 3)<sup>3)</sup>、あるいは分子内ボラート構造によって(化合物4)<sup>4)</sup>Z-体への固定と回転阻害を目的としたGFPクロモホアモデル化合物が設計、合成されその蛍光特性が報告されている。一方、分子会合による蛍光を狙ったβ-アミロイドとのコンジュゲート体(化合物5)<sup>5)</sup>なども報告されているが、いずれもベンジリデン様構造を持つ点に変わりはない。

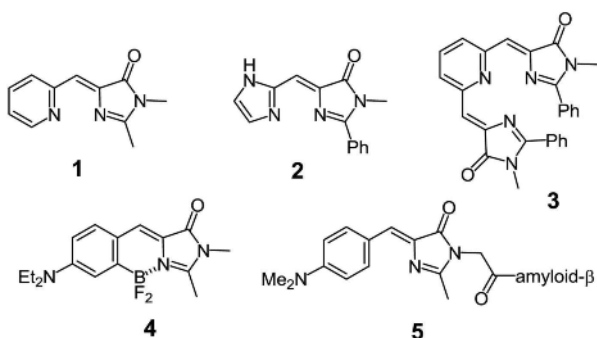


図3 代表的な GFP クロモホアモデル化合物

これに対して筆者らの設計においては、ベンジリデン基をジアリールメチレン基に置き換えてDAIN

構造6としてしまうもので、これによって幾何異性体が存在しなくなるのでE-体への異性化による蛍光減弱はなくなる。一方、ジアリールメチレン基の回転は、ベンジリデン基と同様に起こり得るので、回転による蛍光能の消失は起こり得ると考えられる。すなわち、DAIN類6はジアリールメチレン基の回転の可否をスイッチとする蛍光プローブになると考えた(図4)<sup>6,7)</sup>。



図4 筆者らのモデル化合物DAIN (6)

### 3. DAIN類の合成

ベンジリデン基を有するイミダゾリノン類は、一般的にイミダゾリノンとベンズアルデヒドとの反応により合成される。しかし、ベンズアルデヒドの代わりにベンゾフェノンを用いてもジフェニルメチレン体を得ることはできなかった。

筆者らは、本研究開始以前にある天然物の合成研究を行っていたが、その過程で図5に示すようなイミノ酢酸エステル誘導体7とチオイミダート8とのカップリング反応によるデヒドロアミノ酸9の合成を検討した。イミノ酢酸エステル7のα位は活性であり、これまでもα位の不斉アルキル化反応等により、様々な非天然型アミノ酸類合成に用いられた報告があることから、当然、α位とイミダート間で結合が形成され、化合物9が得られるものと期待して反応の検討を行った。

両化合物をトルエン中で加熱したところ、薄層クロマトグラフィー上、ほぼ1 spotで生成物が確認された。精製後、構造確認を行ったところ、そのNMRは9の構造から予想されるものとは全く異なるもので、最終的にX線結晶解析によってDAIN構造6であることが確認された(図5)。

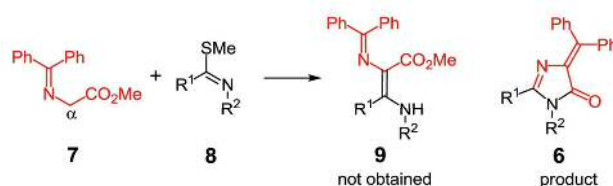


図5 イミノ酢酸エステルとチオイミダートの反応

本反応において、ジフェニルメチレン基が窒素原子上からエステル $\alpha$ 位の炭素上に転位しているが、反応機構については、図6に示すように考えている。チオイミダート8に7のイミン窒素が求核攻撃した結果、10を経由してベンジルカチオン種11が生成する。この炭素陽イオンは2個のフェニル基によって安定化されており、本反応進行上、重要な役割を果たしているものと考えられる。引き続き11のエステル $\alpha$ 位炭素の分子内求核攻撃によりアジリジン体12が形成され、窒素-ベンジル位間の結合が切断されることにより、ジフェニルメチレン基の $\alpha$ 位炭素上への転位が完了し、最終的に分子内閉環反応によりDAIN 6が生成すると考えられる。

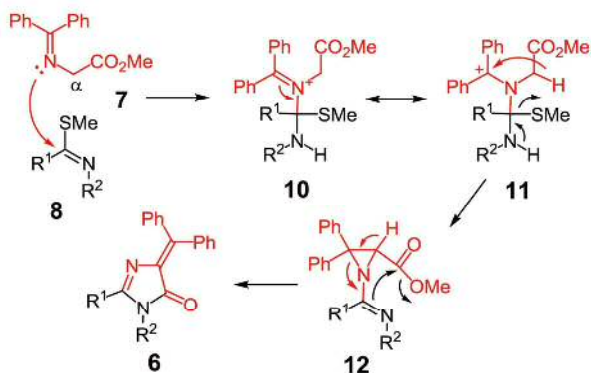


図6 DAIN生成反応機構

本反応をDAIN類の合成に応用するにあたって、さらに詳細に反応の条件検討を行った結果、酢酸程度の弱酸の添加によって反応は円滑に進行し、チオイミダートだけでなくイミダートでも反応は進行することがわかった。また、種々のイミノ酢酸エステル類と種々のイミダート、チオイミダート類を反応させ、各種DAIN類が概ね中程度から好収率で得られることが明らかとなり、汎用性にも優れた反応であることがわかった。図7に合成したDAIN類を示したが、合成の詳細については原報を参照いただきたい<sup>7)</sup>。

#### 4. DAIN類の蛍光特性

得られたDAIN 6の蛍光特性を評価したところ、予想通り溶液状態ではほぼ無蛍光であった。一方、粉末状態や凍結した溶液状態においては、多くのDAINに蛍光が観察された(図7)。このことから、DAIN構造においても、ジアリールメチレン部の回転を抑制することで、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、粉末状態での蛍光特性について詳細な解析を行ったところ、無置換のジフェニル基を有するDAINにおいても、イミダゾリノン環に接合する構造の違いによって、493 nm ~ 540 nmの蛍光(目視の色として、シアン~黄色)が観察された。蛍光量子収率も構造により様々

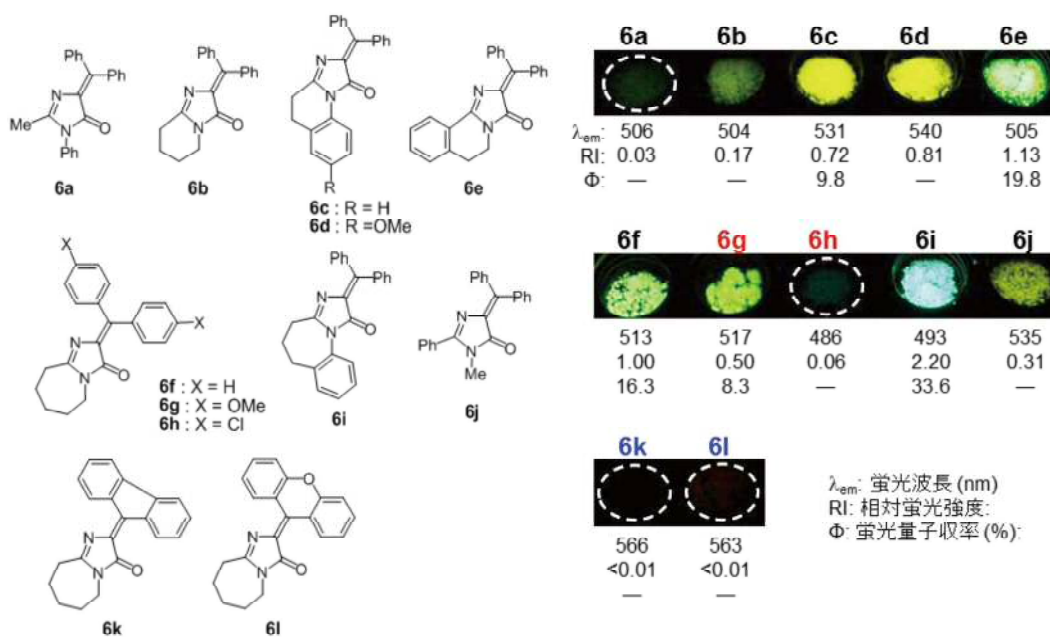


図7 DAIN類の構造と粉末状態における蛍光特性

であったが、強い発光を示すDAINは、概ね10%~30%程度の値となった。ジフェニル部に置換基を有するDAIN (6g, 6h) については、置換基の効果による蛍光波長の変化はみられたものの、蛍光量子収率の低下が観測された。次に、2つのアリール環を固定したDAIN (6k, 6l) についても粉末状態での蛍光特性を評価したところ、励起波長、蛍光波長の長波長シフトは観測されたが、蛍光量子収率の大幅

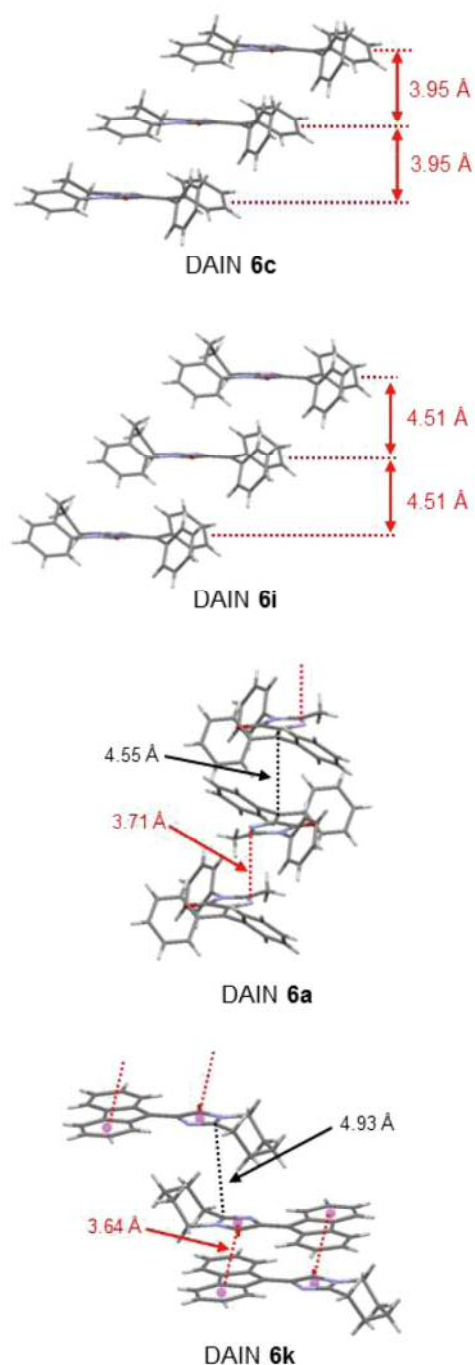


図8 DAIN類の分子配列

な低下が観測された。この2種のDAINの設計は、アリール環部の回転制御 (twist 構造の制御) による無放射失活過程の抑制を意図したものであったため、蛍光量子収率の低下は予想外の結果であった。

上記の粉末状態における蛍光特性の結果は、DAIN単分子の立体構造や電子密度では説明のつきにくいものであったため、X線結晶構造解析を用いて分子同士の配列状態について調べたところ、蛍光を示すDAIN (DAIN 6c, 6i) と示さないDAIN (DAIN 6a, 6k) とでは異なる空間群になることが判明した (図8)。DAIN 6cと6iは共に  $P2_1/c$  群となり、各分子が平行かつ階段状に配列しており、分子間の $\pi$ 軌道の重なりが少ない、ずれた配置になっていた。一方、DAIN 6aと6kはそれぞれ  $P-1$  群、 $C2/c$  群であり、逆平行かつ層状のような配列となっており、これらの配置では分子間の $\pi$ 軌道の重なりが想定された。一般に固体物質の蛍光では $\pi-\pi$ 相互作用は消光の要因となることから、DAIN類においても $\pi$ 軌道の重なりが蛍光の有無を決める一因であると考えられる。

ジフェニル型DAINが我々の想定通りの蛍光スイッチ活性を示したことから、対応する天然型GFPクロモホア構造 (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)。その結果、BDIをDAINにすることで、すなわちベンゼン環を1つ追加することで粉末蛍光における蛍光波長の長波長シフト (+64 nm) と蛍光量子収率の向上 (約9倍) が観測された。また、*E*-BDI構造では、粉末状態においてもほぼ無蛍光であったことから、*Z*-, *E*-光異性化による構造変換の無いDAIN骨格の有用性が確認できた。

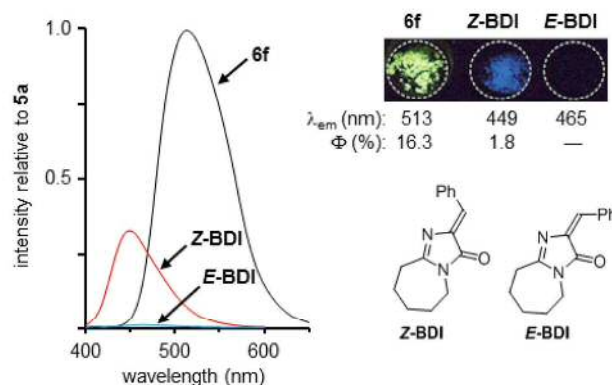


図9 BDIとの蛍光特性の比較



上記の結果から、DAINは分子運動の制御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、この機能を利用した蛍光プローブへの展開について、現在、様々な検討を進めている。その一例として、オリゴヌクレオチドの二重鎖形成による蛍光スイッチング機能について紹介する。図10に示すように、シトシン5位にアセチレン鎖を介してDAINを導入したヌクレオシド dC<sup>DAIN</sup> を合成し、それを導入したオリゴヌクレオチドを用いて相補鎖との二重鎖形成時における蛍光評価を行った。その結果、dC<sup>DAIN</sup> に対応する塩基がミスマッチ配列の場合には蛍光強度の増加が見られたのに対し、マッチする配列においては、蛍光強度の低下が観測された。これは、二重鎖形成時のDAINの位置環境がマッチ配列とミスマッチ配列によって大きく異なり、特にミスマッチ配列においては、DAIN部分が二重らせんの疎水環境に入り込むことで他の塩基との相互作用が生じ、その分子運動が制御されたためと考えられる<sup>8)</sup>。

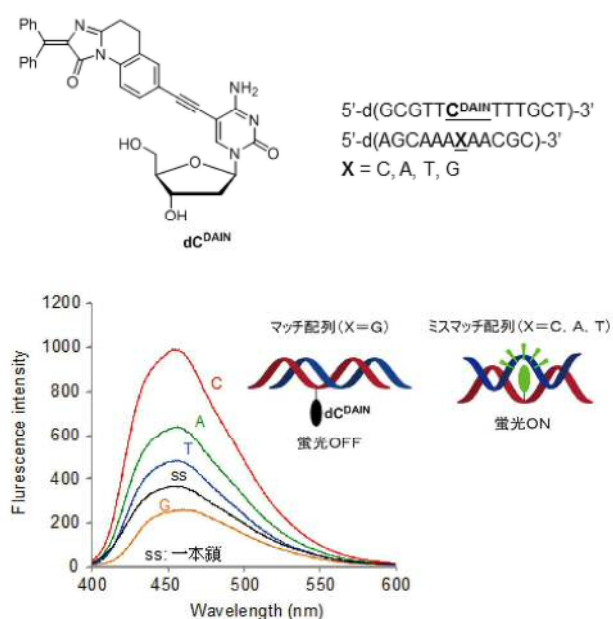


図10 DAIN-オリゴヌクレオチドの蛍光特性

## 5. まとめ

これまでの蛍光プローブは、分子の電子状態の変化（電子密度の上昇、減少あるいは偏り）を蛍光スイッチにしているものが多いのに対して、DAIN類はジアリールメチレン構造の回転の可否が蛍光スイッチになっている点がその特徴であり、新たな蛍光

イメージングや蛍光センサーへの応用が期待される。

これまでのところ著者等の「ジアリールメチレン構造の回転の可否」を蛍光のスイッチとする具体的な例として、DNA二重鎖との相互作用への応用に成功していることを示した。現在、二重鎖DNAの代わりにタンパク質との相互作用への応用や、回転の容易さの指標として粘性（流動性）に着目し、細胞膜等の粘性プローブへの応用について検討を行っている。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、日々、実験に励んでくれた大阪大谷大学薬学部有機化学講座の学生諸君に感謝します。本研究は、大阪大学大学院薬学研究科 小比賀聡教授（生物有機化学分野）との共同研究によるものであり、ご協力と今回、研究紹介の機会を与えていただいた小比賀教授に深く感謝します。

## 文献

- 1) 総説 Zimmer, M., *Chem. Rev.*, **2002**, *102*, 759-781.
- 2) 総説 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) Baldrige, A.; Solntsev, K. M.; Song, C.; Tanioka, T.; Kowalik, J.; Tolbert, L. M., *Chem. Commun.*, **2010**, *46*, 5686-5688; 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; Shi, L.; Li, Y.; Liu, Z. P.; James, T. D.; Long, Y.-T., *Talanta*, **2012**, *100*, 401-404.
- 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) Clark, T. B.; Ziolkowsky, M.; Schantz, G. C.; Goodson, T., *J. Phys. Chem. B*, **2014**, *118*, 2351-2359.
- 6) Ikejiri, M.; Tsuchino, M.; Chihara, Y.; Yamaguchi, T.; Imanishi, T.; Obika, S.; Miyashita, K. *Org. Lett.*, **2012**, *14*, 4406-4409.

- 7) 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.
- 8) Okuda, T.; Mori, S.; Kasahara, Y.; Morihito, K.; Ikejiri, M.; Miyashita, K.; Obika, S., *Tetrahedron Lett.*, **2016**, *57*, 3129-3132.

