

色素系化合物の光毒性を抑制する新たな手法の開発

東京大学大学院薬学系研究科

寺 井 琢 也

When dye molecules are excited by UV or visible light, singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) is generated via energy transfer from excited triplet state of the molecules. Because the photo-generated $^1\text{O}_2$ is known to cause damage to cells, it is important to establish methods to decrease the amount of generated $^1\text{O}_2$, or to erase $^1\text{O}_2$ by chemical reaction. We believe such methods will be useful not only in bioimaging but also in cosmetology. Hence, in this research, we studied on the singlet oxygen eliminating effect of lanthanide ions that are co-existent in the system. The idea was that when lanthanide ions that could accept energy from the excited dyes were present nearby, the ions would work as surrogate acceptors in place of molecular oxygen, whereby decreasing the efficiency of $^1\text{O}_2$ generation. In order to verify this hypothesis, we firstly synthesized several fluorescent compounds and their lanthanide complexes, and measured characteristic luminescence of $^1\text{O}_2$ at 1270 nm. The results indicated that $^1\text{O}_2$ generation is attenuated when the compounds chelate a specific kind of lanthanide ions, supporting our hypothesis. Also, we have demonstrated that some lanthanide ions are capable of decreasing the amount of generated $^1\text{O}_2$ through intermolecular interactions. As far as we are concerned, these findings are unprecedented, and worth further investigation.

1. 緒 言

太陽光などに含まれる紫外線は、細胞内の生体分子 (DNA、タンパク質など) を光励起して活性酸素の一種である一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) を発生させ、生体に対して皮膚の老化を初めとする悪影響を及ぼすことが知られている。従って、アスタキサンチンに代表されるように一重項酸素消去能を持つ化合物を配合した化粧品が近年上市され、効果を発揮している。

一方、蛍光色素を用いた細胞や動物個体の光イメージングは、生体内での目的分子の挙動をリアルタイムで解析するための強力な研究手法であり、今日の生命科学研究において不可欠な役割を担っている^{1), 2)}。しかしながら、多くの蛍光色素は光励起に伴い生体分子と同様に一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) を産生する (光増感反応)。先にも述べたとおり、一重項酸素は細胞に対して酸化ストレスを与えて細胞死を導いたり³⁾、近傍のタンパク質と反応してその活性を消失させたりする性質 (光毒性) を有しており⁴⁾、そうした悪影響を抑えることは蛍光イメージングにおいても重要な課題の一つである。

一般に、一重項酸素消去能を有する化合物は、その還元力により一重項酸素と量論的に反応することでこれを消去する。しかしこの機構を用いる限り、添加した化合物の量

以上の一重項酸素を消去することはできない。更に、これらの還元剤は化学的に不安定であることが多く、取り扱いも容易ではない。従って我々は、化粧品への応用や蛍光イメージング技術への貢献を念頭に、①安定な構造を持ち、②一重項酸素と化学的に反応することがない、新たな消去手法の開発を目指し研究を開始した。

ところで一重項酸素は、色素 (あるいは蛍光分子) の光励起に引き続く項間交差によって励起三重項状態が生じ、この状態から分子酸素へのエネルギー移動が起こることで生成するとされる。そこで我々は、生じた励起三重項状態を酸素との反応以外の失活経路によって速やかに消失させることにより一重項酸素の発生自体を抑制する、という新しい発想 (Fig. 1) で上記の課題を解決することを着想した。具体的には、光増感反応と競合する失活経路として、色素の励起三重項状態より低い位置に励起状態を有する化合物、特に Nd^{3+} や Yb^{3+} といった希土類イオン (Ln^{3+}) に対するエネルギー移動を考えた。これらのイオンは一重項酸素とはほぼ同じ低い位置に励起状態が存在するため、一旦 (酸素分子ではなく) 希土類イオンへのエネルギー移動が生じると、そこからの光増感反応はほとんど起こらないことが予想される。即ち、分子内もしくは分子間にこれらのイオンを配置して、色素の励起三重項状態からイオンへのエネルギー移動が優先的に起こるようにすれば、光が色素に当たっても一重項酸素が産生されず、毒性が抑えられると考えた。

この方法では、励起された希土類イオンは発光もしくは熱失活過程によりエネルギーを失うため^{5), 6)}、一重項酸素のように生体分子と反応して酸化修飾を引き起こすことは考えにくい。また、3価の希土類イオンは化学的にも安定であるため、従来の不可逆的な還元剤とは異なりこの消去



Development of a novel methodology to suppress phototoxicity of colored compounds

Takuya Terai

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo

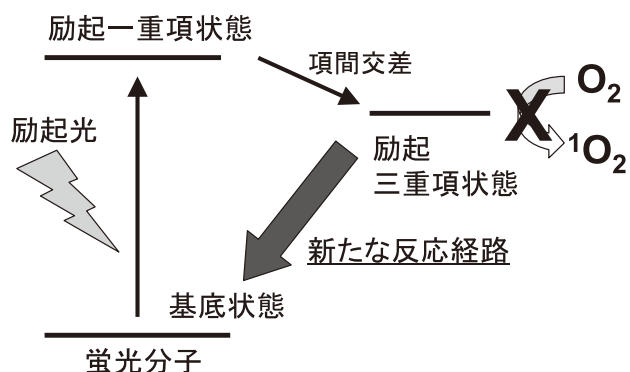


Fig. 1 研究の概念図

過程を何度も繰り返すことが可能と期待される。

本研究では初期検討として、まずはFig. 1の系が実際に機能するのかについて、代表的な色素分子を用いた溶液中の実験で検討した。

2. 実験

2.1 試薬

市販されている試薬類については、和光純薬、東京化成工業、もしくはSIGMA-ALDRICH社から購入し、特に明示しない限り更なる精製はせずに用いた。2',7'-dichlorocalcein (2)、2OMe-BODIPY (4)、2OMe-BODIPY-DTPA (5)、並びにそれらの金属錯体は文献を参考に合成を行った^{7), 8)}。合成した化合物についてはNMRおよびESI-MSにて構造の確認を行い、HPLCにより純度

を確認した。なお、本報告に登場する化合物の構造をFig. 2にまとめて示す。

2.2 測定装置

吸光測定には島津UV-1800を用いた。蛍光測定には日立F4500もしくは堀場Jobin Yvon Fluorolog-3を用いた。一重項酸素生成能の評価(赤外発光測定)には堀場Jobin Yvon Fluorolog-3 (InGaAs検出器)を用いた。また、単一光照射には分光計器UB-25を用いた。波長により多少の違いはあるものの、光量は約3 mW/cm²であった。

2.3 実験方法

吸光・蛍光・発光測定においては、測定対象化合物のストック溶液(1~10 mM in DMSO or DMF)を用意し、別途明示する溶媒で希釈することで、吸光・蛍光測定の場合には約1 μM、DPBFを用いた吸光測定もしくは¹O₂の発光測定の場合には約10 μMの溶液を調製した。測定は20~25℃で行い、特に明示しない限り脱気等の操作は行わなかった。各種スペクトルは、別途測定した溶媒のみのスペクトルを差し引いて示した。一重項酸素生成能(発光)については、バックグラウンドシグナルの傾きを考慮して1270 nmのピーク高さを算出し、励起波長における吸光度で補正することで比較した⁹⁾。DPBFを用いた¹O₂の定量については、メタノール溶媒中における410 nmの吸光度の減少から見積った¹⁰⁾。

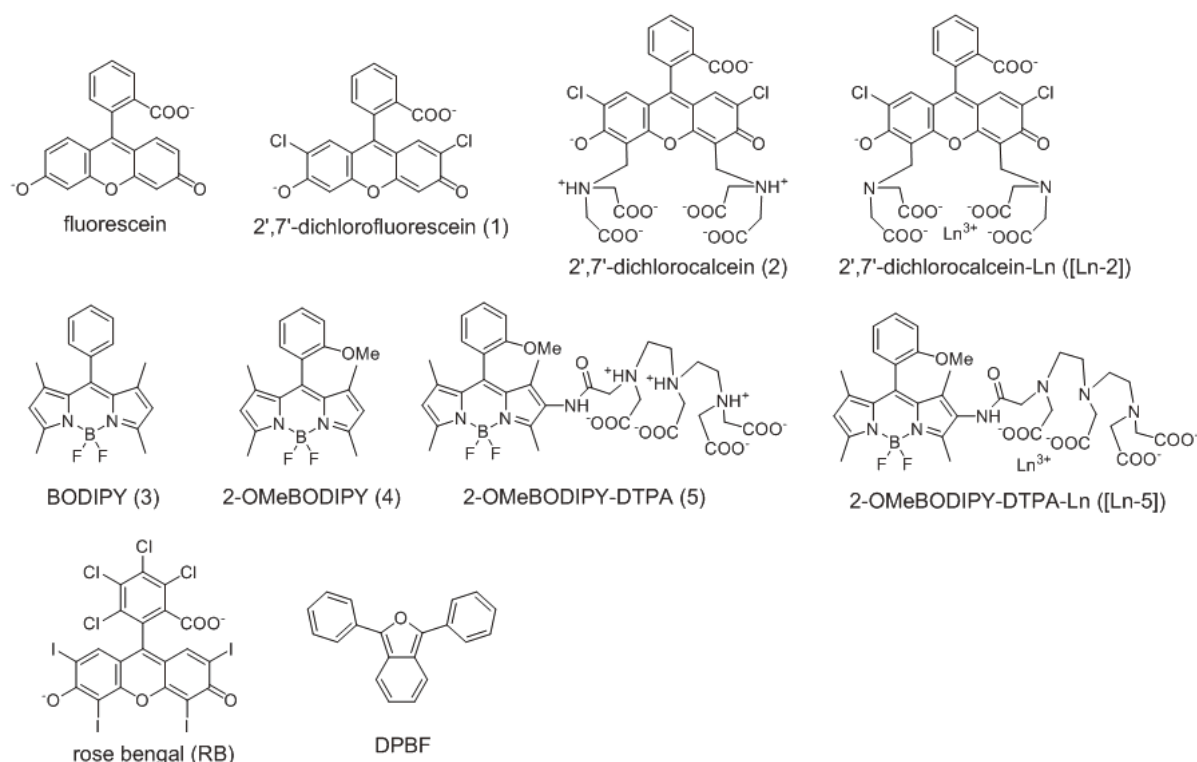


Fig. 2 化合物の構造

3. 結果

3.1 Fluorescein誘導体における分子内消光

Fluoresceinは最も代表的な有機蛍光分子の一つであり、様々な蛍光プローブの基本骨格として利用されている²⁾。その一方で、fluorescein誘導体は一定の増感能を有することが知られており、強い光を当てることで $^1\text{O}_2$ を産生し細胞にダメージを与える場合がある¹¹⁾。そこで我々はまず、分子内に希土類イオンを導入したfluorescein誘導体 [Ln-2] が、母化合物である**1**および配位子**2**と比較して低い増感能を持つかどうかについて検討を行った。

各化合物の吸収スペクトルと近赤外発光スペクトルをFig. 3に示した。スペクトル測定は、 $^1\text{O}_2$ の寿命が通常の水よりも長い重水 (D_2O) 中で行った。吸収スペクトルにはほとんど変化が見られなかったのに対し、1270nm付近の発光強度は**1**>**2**>> [Yb-2] の順となり、化合物間で大きな差異が見られた。化合物を加えない場合にはこの位置にピークを有する発光は全く見られないことから、これは各化合物の励起状態からエネルギー移動を介して生成する $^1\text{O}_2$ に由来するものと判断される。なお、[Yb-2]の発光スペクトルが短波長側で大きく増大する形状になるのはcalceinの励起状態を介するYb³⁺の発光に由来するものであり⁷⁾、 $^1\text{O}_2$ とは無関係であることを別途確認している。

この結果から、[Yb-2]の $^1\text{O}_2$ 生成量は**1**や**2**と比較して小さくなっており、希土類イオンを色素の近傍に配置することで元の化合物より増感能が低下することが示唆された。

3.2 BODIPY誘導体における分子内消光

BODIPY (化合物**3**)はfluoresceinと並ぶ代表的な可視

光蛍光団の一つであり、蛍光プローブの基本骨格としても汎用されている¹²⁾。そこで我々は、BODIPYについてもfluoresceinの場合と同様に、希土類イオンの導入によって $^1\text{O}_2$ 生成能が変化するかどうかを調べた。具体的には、化合物**4**、**5**、および[Yb-5]について吸収スペクトルおよび近赤外発光スペクトルを測定した。

その結果をFig. 4に示す。測定は、BODIPYの溶解性を考慮してメタノール中で実施した。化合物**4**のみ吸光度が大きいのは、濃度が他の2つより高いからである(注：励起波長における吸光度の値がほぼ一定になるように濃度調整を行った)。発光スペクトルに関しては、ベースラインの傾きを考慮し、更に励起波長である500nmの吸光度で補正すると、**5**>[Yb-5]>**4**であることが示唆された。金属を含まない化合物**5**と比較すると、Yb³⁺錯体の増感能の低下が認められたものの、前項の実験とは異なりその差が大きいものではないため更なる検討が必要と考えられる。

3.3 Rose bengalにおける分子間消光

Fluoresceinに重原子を導入した化合物であるrose bengal (RB)は、非常に高い $^1\text{O}_2$ 産生能を有する代表的な光増感剤である¹³⁾。3.1、3.2の検討においては色素分子(蛍光団)が直接希土類イオンに配位している場合を想定したが、実際の応用においてはそのような場合は稀と考えられる。そこで本項では、溶媒内に分子間で存在するLn³⁺によりRBの増感能が制御されるか否かについて調べた。具体的には、メタノールにRBとLnCl₃をそれぞれ2μM、100μMとなるよう溶解させ、530nmの光照射により産生される $^1\text{O}_2$ の発光スペクトルを測定した。

吸収スペクトルと合わせた測定結果をFig. 5に示す。化合物の吸収スペクトルは希土類イオン添加の有無によりわ

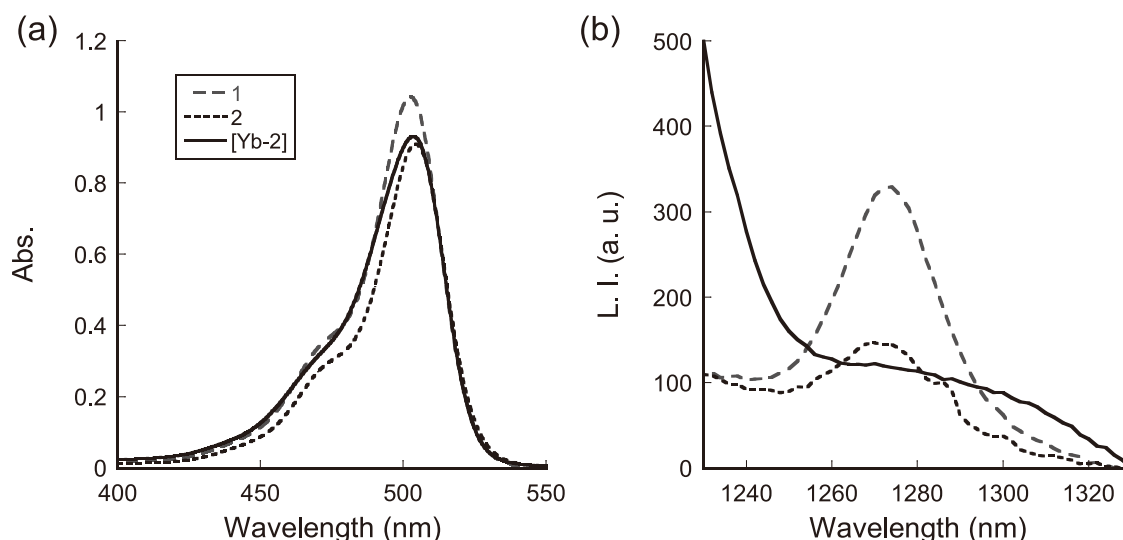


Fig. 3 化合物**1**, **2**および[Yb-2]の(a)吸収スペクトル、および(b)近赤外発光スペクトル。測定は重水(10mM HEPES 緩衝液)中で行った。励起波長: 500nm。

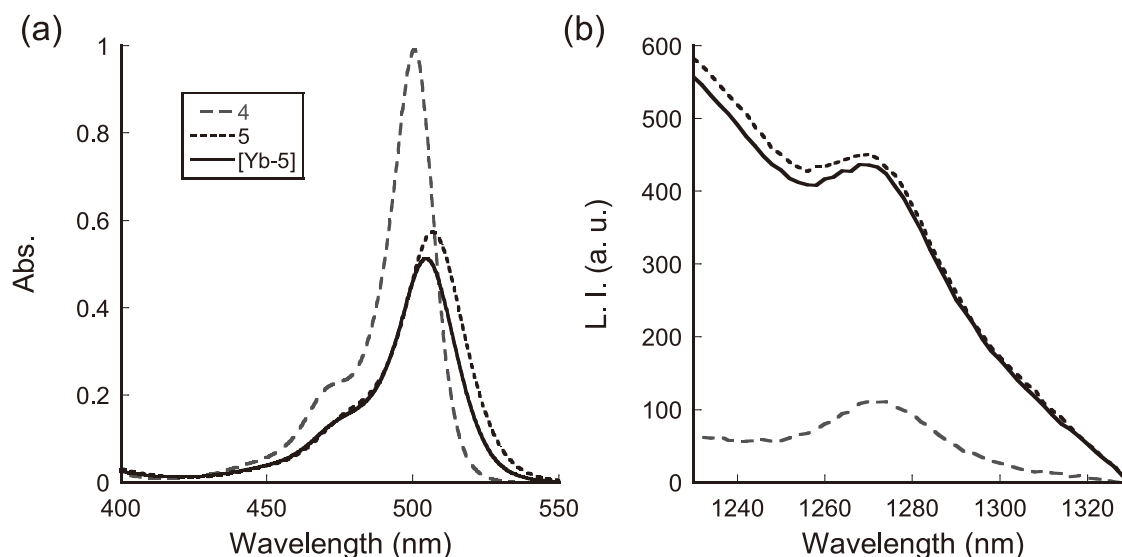


Fig. 4 化合物 4, 5 および [Yb-5] の(a)吸収スペクトル、および(b)近赤外発光スペクトル。測定はメタノール中で行った。励起波長：500nm。

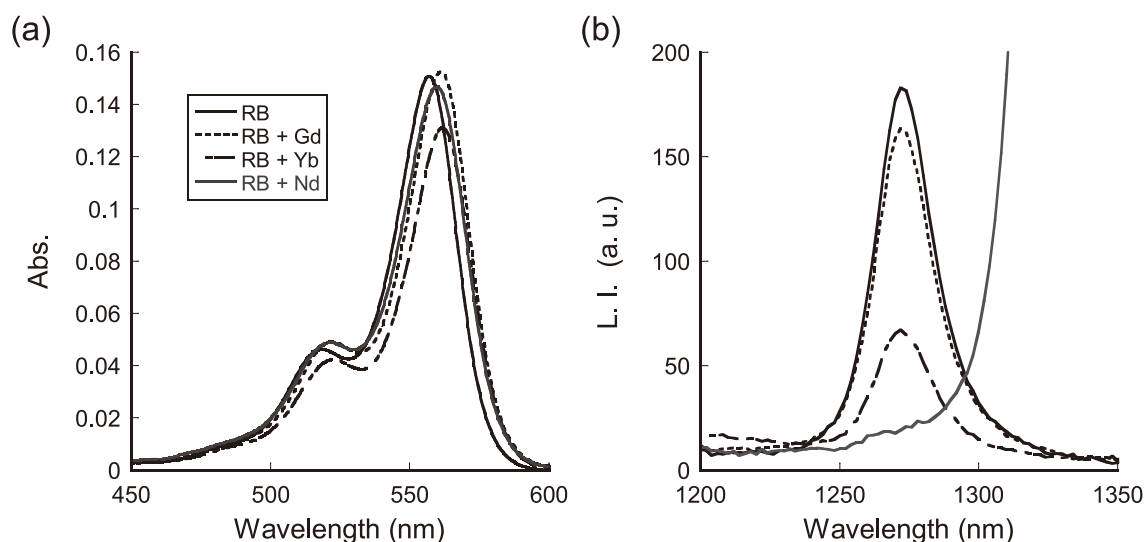


Fig. 5 RB, RB+GdCl₃, RB+YbCl₃, および RB+NdCl₃ の(a)吸収スペクトル、および(b)近赤外発光スペクトル。励起波長：530nm。

ずかに長波長シフトを示したものの、形状や強度の変化はほとんど見られなかった。一方、近赤外発光スペクトルにおいてはYb³⁺ およびNd³⁺ を添加したサンプルのみ有意に強度の低下が観察された。一方、同じ希土類イオンでもGd³⁺ を同量添加したサンプルはRB自体とほとんど変わらない増感能を示した。これは、Gd³⁺ の励起状態が比較的高い位置にあるためRBからのエネルギー移動 (Fig. 1 参照) が生じえないためと説明できる。なお、Fig. 5bにおいてNd³⁺ 添加サンプルの1300nm以上の発光強度 (これはNd³⁺ からの発光である) が大きく上昇していることも、RBからNd³⁺ へのエネルギー移動を支持するデータである。

続いて、同様に調製したサンプルについて、1270nm発光測定とは異なる¹O₂の定量方法である1,3-diphenyl

isobenzofuran (DPBF)を用いた光増感能の評価を行った¹⁰⁾。本法は¹O₂発光測定と比べて間接的ではあるものの、感度には優れている。

具体的には、RB (10μM) とLnCl₃ (100μM) のメタノール溶液に対して50μMのDPBFを添加し、500nmの光照射に伴う410nmの吸光度の減少をモニターした。その結果をFig. 6に示す。Fig. 5の結果を裏付けるように、無添加と比較してYb³⁺ 添加では生成する¹O₂が半分以下に低下することが示唆された。また、Nd³⁺ 添加サンプルではバックグラウンドとほぼ同程度まで吸光度変化が抑制された。一方、Gd³⁺ 添加サンプルにおいては10%程度の低下しか観察されず、これもFig. 5の結果と整合するものであった。

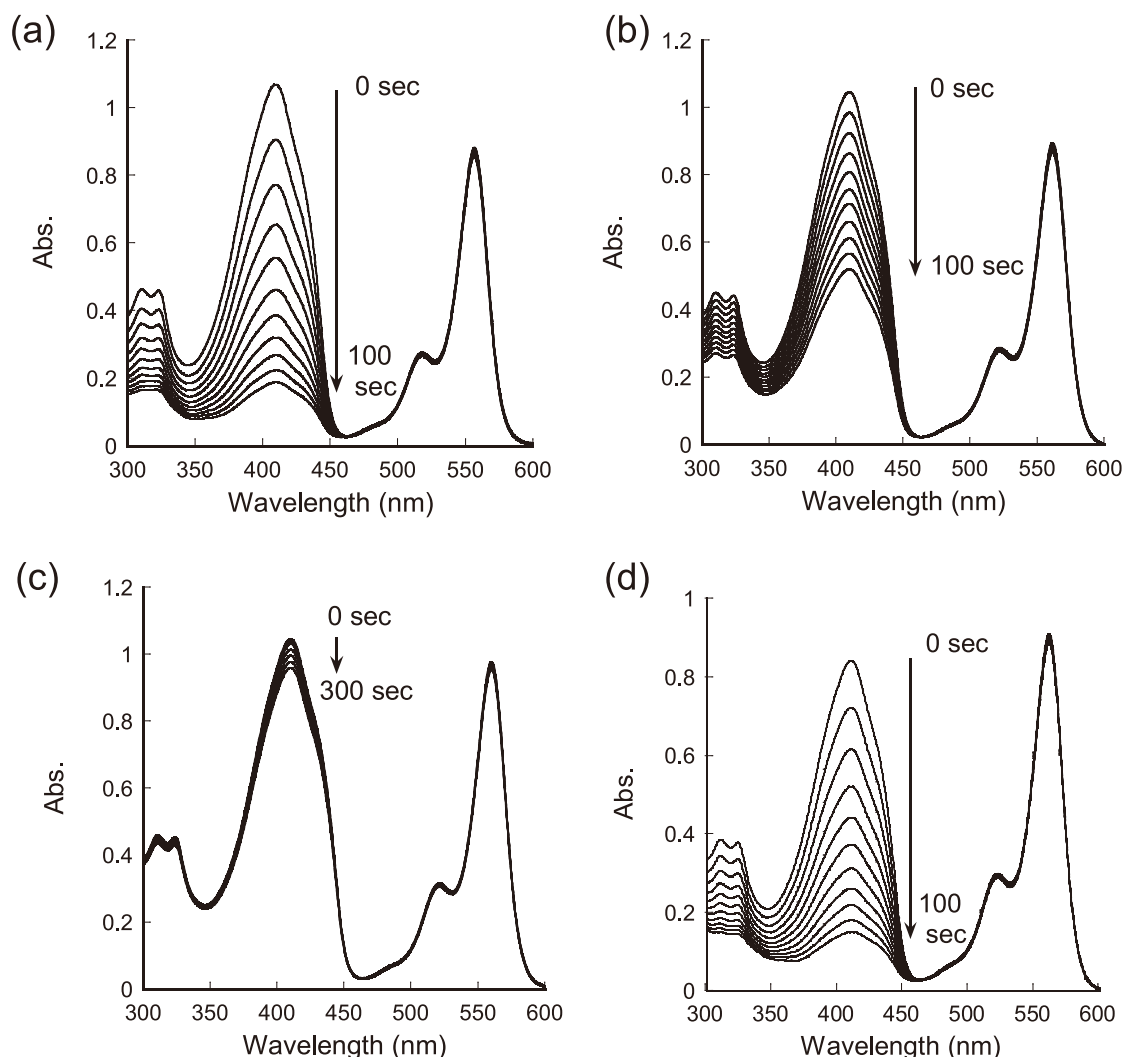


Fig. 6 DPBF を用いた増感能の評価。(a)RB のみ、(b)RB+YbCl₃、(c)RB+NdCl₃、および(b)RB+GdCl₃ の吸収スペクトルの時間変化 グラフ中の数字は 500nm の光照射を行った時間 (秒) を表す。

3.4 BODIPY 誘導体における分子間消光

3.3 の結果を受け、BODIPY 誘導体についても希土類イオンの分子間添加によって¹O₂の生成量に変化が見られるかを検討した。実験にはFig. 6と同様にDPBFを用いた評価系を用いた。

その結果をFig. 7に示す。化合物4はRBと比べて増感能が低いいため、吸光度変化が全体的に小さくなっているが、(a)と(b)を比較するとNd³⁺添加による¹O₂産生の抑制が認められる。しかしながら、その効果はRBの場合 (Fig. 6) よりもかなり小さいことが示唆された。

4. 考 察

本研究では、色素化合物の光励起によって放出される有害分子である¹O₂の生成量を制御する手法として、近赤外領域に発光を持つ希土類イオンに対するエネルギー移動という新たな概念を提唱し、その仮説を検証するための初期検討を行った。

その結果、複数のfluorescein誘導体 (化合物2, RB) において、分子間、分子内に拘わらずある種の希土類イオン添加による大幅な増感能の低下が観察された。この結果は我々が提案する仮説を支持するものであり、化学的にも興味深い現象である。一方、BODIPY 誘導体 (化合物4, 5) を用いた場合には、希土類イオンの添加により一定の増感能低下は認められたものの、その効果はfluorescein誘導体の場合よりも小さかった。

この原因については更なる研究が必要ではあるが、現時点で考えられることとして、①化合物によって励起三重項状態から酸素分子へのエネルギー移動速度が異なる、②化合物によって励起三重項状態から希土類イオンへのエネルギー移動速度が異なる、③色素と希土類イオンとの静的相互作用 (複合体形成など) が生じる、が挙げられる。

今後は本研究で提案した手法の一般性と適用限界について明らかにすべく、UV領域に吸収を有する化合物を用いた検討や固体試料における評価を進めていく計画である。

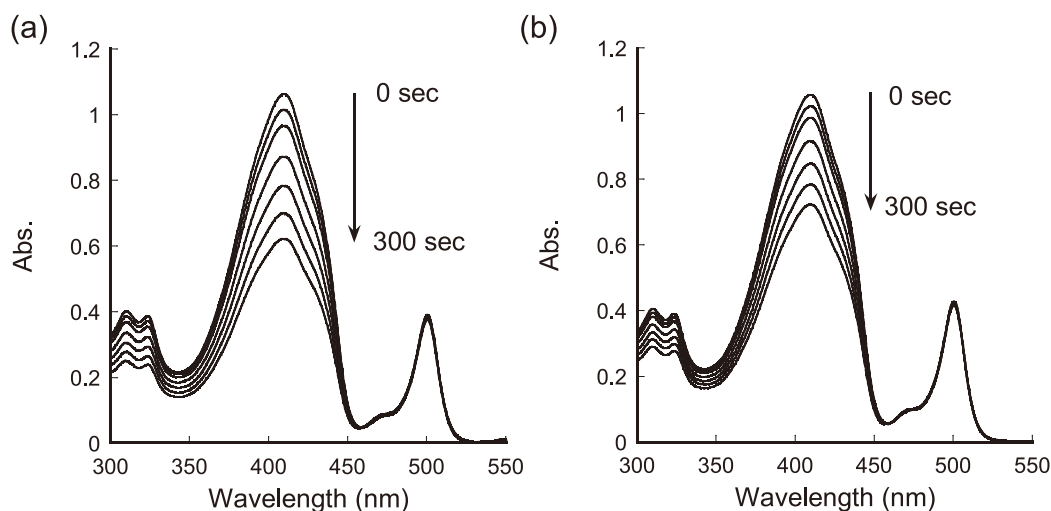


Fig. 7 DPBF を用いた増感能の評価。(a) 4 のみ、および(b) 4+NdCl₃ の吸収スペクトルの時間変化グラフ中の数字は 500nm の光照射を行った時間 (秒) を表す。

(参考文献)

- 1) Lakowicz JR: Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd Ed., Springer-Verlag, New York, 2006.
- 2) Terai T, Nagano T: Fluorescent probes for bioimaging applications, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 12, 515-521, 2008.
- 3) Koide Y, Urano Y, Yatsushige A, Hanaoka K, Terai T, Nagano T: Design and Development of Enzymatically Activatable Photosensitizer Based on Unique Characteristics of Thiazole Orange, *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 6058-6059, 2009.
- 4) Yogo T, Urano Y, Mizushima A, Sunahara H, Inoue T, Hirose K, Iino M, Kikuchi K, Nagano T: Selective photoinactivation of protein function through environment-sensitive switching of singlet oxygen generation by photosensitizer, *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.*, 105, 28-32, 2008.
- 5) Hänninen P, Härmä H (eds): Lanthanide Luminescence - Photophysical, Analytical and Biological Aspects, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2011.
- 6) Terai T, Kikuchi K, Iwasawa S, Kawabe T, Hirata Y, Urano Y, Nagano T: Modulation of Luminescence Intensity of Lanthanide Complexes by Photoinduced Electron Transfer and Its Application to a Long-Lived Protease Probe, *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 6938-6946, 2006.
- 7) Terai T, Urano Y, Izumi S, Kojima H, Nagano T: A practical strategy to create near-infrared luminescent probes: conversion from fluorescein-based sensors, *Chem. Commun.*, 48, 2840-2842, 2012.
- 8) Sunahara H, Urano Y, Kojima H, Nagano T: Design and Synthesis of a Library of BODIPY-Based Environmental Polarity Sensors Utilizing Photoinduced Electron-Transfer-Controlled Fluorescence ON/OFF Switching, *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 5597-5604, 2007.
- 9) Yamakoshi Y, Umezawa N, Ryu A, Arakane K, Miyata N, Goda Y, Masumizu T, Nagano T: Active Oxygen Species Generated from Photoexcited Fullerene (C₆₀) as Potential Medicines: O₂^{-•} versus ¹O₂, *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 12803-12809, 2003.
- 10) Gorman AA, Hamblett I, Lambert C, Spencer B, Standen MC: Identification of Both Preequilibrium and Diffusion Limits for Reaction of Singlet Oxygen, O₂(¹Δ_g), with Both Physical and Chemical Quenchers: Variable-Temperature, Time-Resolved Infrared Luminescence Studies, *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 8053-8059, 1988.
- 11) Keppler A, Ellenberg J: Chromophore-Assisted Laser Inactivation of α- and γ-Tubulin SNAP-tag Fusion Proteins inside Living Cells, *ACS Chem. Biol.*, 4, 127-138, 2009.
- 12) Komatsu T, Urano Y, Fujikawa Y, Kobayashi T, Kojima H, Terai T, Hanaoka K, Nagano T: Development of 2,6-carboxy-substituted boron dipyrromethene (BODIPY) as a novel scaffold of ratiometric fluorescent probes for live cell imaging, *Chem. Commun.*, 7015-7017, 2009.
- 13) Lessing HE, Richardt D, von Jena A: Quantitative triplet photophysics by picosecond photometry, *J. Mol. Struct.*, 84, 281-292, 1982.