

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4656541号

(P4656541)

(45) 発行日 平成23年3月23日 (2011. 3. 23)

(24) 登録日 平成23年1月7日 (2011. 1. 7)

(51) Int. Cl. F I
GO 1 N 33/84 (2006. 01) GO 1 N 33/84 Z
C 1 2 Q 1/02 (2006. 01) C 1 2 Q 1/02
GO 1 N 21/78 (2006. 01) GO 1 N 21/78 C
GO 1 N 21/64 (2006. 01) GO 1 N 21/64 F

請求項の数 7 (全 33 頁)

(21) 出願番号	特願2008-25643 (P2008-25643)	(73) 特許権者	505176556
(22) 出願日	平成20年2月5日 (2008. 2. 5)		コリア ユニバーシティ インダストリアル
(65) 公開番号	特開2008-292453 (P2008-292453A)		アンド アカデミック コラボレイシ
(43) 公開日	平成20年12月4日 (2008. 12. 4)		ョン ファウンデーション
審査請求日	平成20年2月5日 (2008. 2. 5)		大韓民国, ソウル 136-701, ソン
(31) 優先権主張番号	10-2007-0051131		ブーク, アナムードン, 5-カ, 1, コ
(32) 優先日	平成19年5月25日 (2007. 5. 25)		リア ユニバーシティ内
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)	(74) 代理人	100077805
			弁理士 佐藤 辰彦
		(74) 代理人	100081477
			弁理士 堀 進
		(74) 代理人	100099690
			弁理士 鷺 健志
		(74) 代理人	100109232
			弁理士 本間 賢一

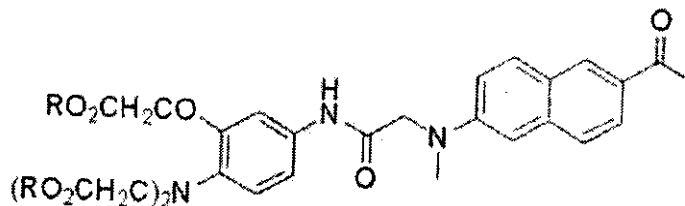
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 二光子励起蛍光プローブの製造方法及び細胞内マグネシウムのリアルタイムモニタリング方法

(57) 【特許請求の範囲】

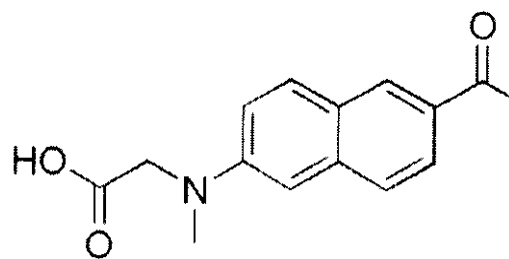
【請求項 1】

化学式 1 で表わされる化合物からなる細胞内マグネシウムイオンのリアルタイムモニタリング用二光子励起蛍光プローブの製造方法であって、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド・HCl と、4-ジメチルアミノピリジンと、化学式 2 で表わされる化合物と、化学式 3 で表わされる化合物とを反応させる段階を含むことを特徴とする二光子励起蛍光プローブの製造方法。

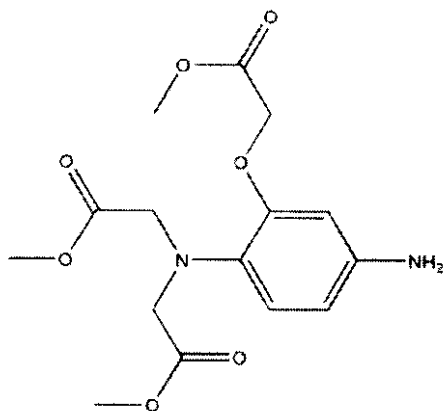


... (1)

(式中、R は、H または $\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$ である。)



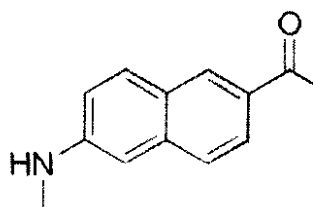
... (2)



... (3)

【請求項 2】

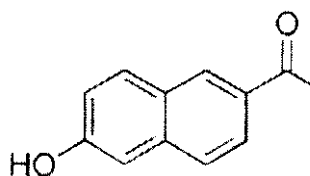
前記化学式 2 で表わされる化合物は、メチルプロモアセテートと、 Na_2HPO_4 、 NaI と、化学式 4 で表わされる化合物とを反応させて製造されるものであることを特徴とする請求項 1 記載の二光子励起蛍光プローブの製造方法。



... (4)

【請求項 3】

前記化学式 4 で表わされる化合物は、 $\text{CH}_3\text{NH}_2 \cdot \text{HCl}$ 、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 、 NaOH 、 H_2O 及び化学式 5 で表わされる化合物を反応させて製造されるものであることを特徴とする請求項 2 記載の二光子励起蛍光プローブの製造方法。



... (5)

【請求項 4】

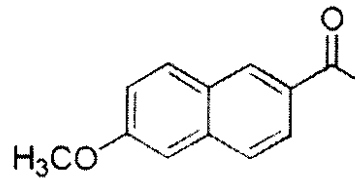
前記化学式 5 で表わされる化合物は、化学式 6 で表わされる化合物と共に HBr を反応させて製造されるものであることを特徴とする請求項 3 記載の二光子励起蛍光プローブの製造方法。

10

20

30

40



・・・(6)

【請求項5】

請求項1の製造方法により製造した二光子励起蛍光プローブを観察対象となる細胞内に注入し、該二光子励起蛍光プローブから放出される二光子励起蛍光をイメージ化する段階を含むことを特徴とする細胞内マグネシウムのリアルタイムモニタリング方法。

10

【請求項6】

前記二光子励起蛍光プローブは、波長が500～620nmの範囲で励起されることを特徴とする請求項5記載の細胞内マグネシウムのリアルタイムモニタリング方法。

【請求項7】

数式1を用いて前記細胞内マグネシウムイオンの濃度を定量的に測定することを特徴とする請求項5に記載の細胞内マグネシウムのリアルタイムモニタリング方法。

$$[Mg^{2+}] = K_d \left[(F - F_{min}) / (F_{max} - F) \right] \quad \dots \text{(数式1)}$$

(式中、 K_d は、前記二光子励起蛍光プローブとマグネシウムイオンとの解離定数、 F は、測定された二光子蛍光強度、 F_{min} 及び F_{max} は、それぞれ最小蛍光強度及び最大蛍光強度である。)

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞内マグネシウムのリアルタイムモニタリング用二光子励起蛍光プローブの製造方法、及びそれを用いた細胞内マグネシウムのリアルタイムモニタリング方法に関するものである。より具体的には、染料の分子量が小さくて細胞内の染色性に優れ、二光子蛍光収率が非常に大きく、細胞内マグネシウムイオンのリアルタイム映像に適した二光子励起蛍光プローブ、その製造方法及びそれを用いた細胞内マグネシウムのリアルタイムモニタリング方法に関する。

30

【背景技術】

【0002】

マグネシウムイオン(Mg^{2+})は、細胞内に最も多く存在する二価金属イオンであって、数百種余りの酵素活性調節に関与するだけでなく、細胞の増殖及び死滅のような多くの細胞における過程で重要な役割を担う。このような細胞内マグネシウムイオンを検出するために、多様な膜透過性蛍光プローブが開発されており、それらのうち一部は市販されている(例えば、非特許文献1、非特許文献2、非特許文献3参照)。それらのうち大部分は、アセトキシメチル(AM)エステルとして用いられるが、これは細胞内で酵素加水分解過程を経て金属イオンプローブに変化される(例えば、非特許文献4参照)。しかし、一光子(OP)蛍光プローブを備えた共焦点顕微鏡は、組織表面(<100μm)近傍のみに使用が制限される。

40

【0003】

従って、組織内部の深い所での細胞現象を観察するためには、二光子顕微鏡(TPM)の使用が必須である。励起のために2個の近赤外線光子を吸収させるTPMは、一光子顕微鏡に比べてさまざまな長所を有する。具体的には、透過深度の増加(>500μm)、組織自己蛍光(auto-fluorescent)及び自己吸収(self-absorption)の低下、及び光損傷(photodamage)及び光脱色(photobleaching)の減少などである(例えば、非特許文献5、非特許文献6参照)。

【0004】

50

特に、T P Mの高い透過性は、組織のイメージ化において非常に重要である。これは損傷された細胞のような表面処理結果物は、脳の薄片内部に70 μm以上延びるためである（例えば、非特許文献7参照）。しかし、現在T P Mとして用いられる大部分の一光子蛍光プローブは、小さな二光子励起蛍光部（two-photon action cross sections: ϕd ）を有するために、その用途がT P Mのみに限定される。組織のイメージ化に関連する他の限界点としては、標的ミス（mistargeting）の問題がある。これは細胞膜結合プローブにより引き起こされる（例えば、非特許文献8、非特許文献9、非特許文献10参照）。前記細胞膜結合プローブは、細胞内の任意の細胞膜で囲まれた構造内に蓄積されるので、蛍光量子収率が、大抵は細胞質より細胞膜の方が高くなる。そのため、細胞膜に結合されたプローブからの信号をプローブ-Mg²⁺複合体の信号から分離することが非常に難しいという不都合がある。

10

【0005】

従って、1)より明るいT P Mイメージを得るために、改善した ϕd 値を有し、2)細胞質内プローブと細胞膜結合プローブとをよりよく区分するために、異なる環境下で、より広いスペクトル移動を示す効率的な二光子励起蛍光プローブを開発する必要性がある。

【非特許文献1】The Handbooks-A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 10th ed, Haugland, R. P. Ed.; Molecular Probes: Eugene, OR, 2005.

【非特許文献2】H. Komatsu, N. Iwasawa, D. Citterio, Y. Suzuki, T. Kubota, K. Tokuno, Y. Kitamura, K. Oka, K. Suzuki, J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 16353-16360.

【非特許文献3】G. Farruggia, S. Iotti, L. Prodi, M. Montalti, N. Zaccheroni, P. B. Savage, V. Trapani, P. Sale, F. I. Wolf, J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 344-350.

20

【非特許文献4】R. Y. Tsien, Nature 1981, 290, 527-528.

【非特許文献5】W. R. Zipfel, R. M. Williams, W. W. Webb, Nat. Biotechnol. 2003, 21, 1369-1377.

【非特許文献6】F. Helmchen, W. Denk, Nat. Methods, 2005, 2, 932-940.

【非特許文献7】R.M.Williams,W.R.Zipfel,W.W.Webb,Curr.Opin.Chem.Biol.2001,5,603-608.

【非特許文献8】The Handbooks-A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 10th ed, Haugland, R. P. Ed.; Molecular Probes: Eugene, OR, 2005.

30

【非特許文献9】J. R. Long, R. S. Drago, J. Chem. Ed. 1982, 59, 1037-1039.

【非特許文献10】K. J. Hirose, Incl. Phenom. Macrocycl. Chem. 2001, 39, 193-209.

【非特許文献11】B. Metten, M. Smet, N. Boens, W. Dehaen, Synthesis 2005, 11, 1838.

【非特許文献12】J. N. Demas, G. A. Crosby, J. Phys. Chem. 1971, 75, 991.

【非特許文献13】C. Reichardt, Chem. Rev. 1994, 94, 2319-2358.

【非特許文献14】H. A. Benesi, J. H. Hildebrand, J. Am. Chem. Soc. 1949, 71, 2703.

【非特許文献15】H. A. Benesi, J. H. Hildebrand, J. Am. Chem. Soc. 1949, 71, 2703.

【非特許文献16】G. Grynkiewicz, M. Poenie, R. Y. Tsien, J. Biol. Chem. 1985, 260, 3440.

【非特許文献17】G. Grynkiewicz, M. Poenie, R. Y. Tsien, J. Biol. Chem. 1985, 260, 3440.

【非特許文献18】R. Y. Tsien, T. Pozzan, T. J. Rink, J. Cell Biol. 1982, 94, 325.

40

【非特許文献19】R. Y. Tsien, T. Pozzan, Methods Enzymol. 1989, 172, 230.

【非特許文献20】A. Takahashi, P. Camacho, J. D. Lechleiter, B. Herman, Physiol. Rev. 1999, 79, 1089.

【非特許文献21】J. R. Long, R. S. Drago, J. Chem. Ed. 1982, 59, 1037.

【非特許文献22】K. Hirose, J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem. 2001, 39, 193.

【非特許文献23】The Handbooks-A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 10th ed,; Haugland, R. P. Ed.; Molecular Probes: Eugene, OR, 2005.

【非特許文献24】H. Szmazinski, J. R. Lakowicz, J. Fluoresc. 1996, 6, 83-95.

【非特許文献25】G. Farruggia, S. Iotti, L. Prodi, M. Montalti, N. Zaccheroni, P. B. Savage, V. Trapani, P. Sale, F. I. Wolf, J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 344.

50

【非特許文献 2 6】I. J. Reynolds, Current Protocols in Neuroscience; Wiley: New York; 1998.

【非特許文献 2 7】J. G. Fitz, A. H. Sostman, J. P. Middleton, Am. J. Physiol. (London) 1994, 266, G677-G684.

【非特許文献 2 8】M. R. Cho, H. S. Thatte, M. T. Silvia, D. E. Golan, FASEB J. 1999, 13, 677-683.

【非特許文献 2 9】G. Farruggia, S. Iotti, L. Prodi, M. Montalti, N. Zaccheroni, P. B. Savage, V. Trapani, P. Sale, F. I. Wolf, J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 344-350.

【発明の開示】

10

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の第 1 の目的は、生体内に存在する多様な金属の内、特にマグネシウムに対するイオン選択性に優れ、二光子蛍光収率が非常に大きくて細胞内マグネシウムイオンのリアルタイムモニタリングに適した二光子励起蛍光プローブの製造方法を提供することである。

【0008】

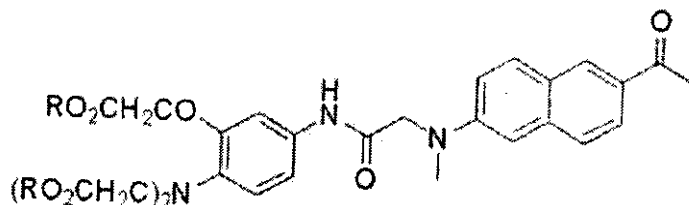
また、本発明の第 2 の目的は、前記二光子励起蛍光プローブを利用した細胞内マグネシウムのリアルタイムモニタリング方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

20

【0010】

本発明は、前記第 1 の目的を達成するため、細胞内マグネシウムイオンのリアルタイムモニタリング用二光子吸収プローブの製造方法を提供する。



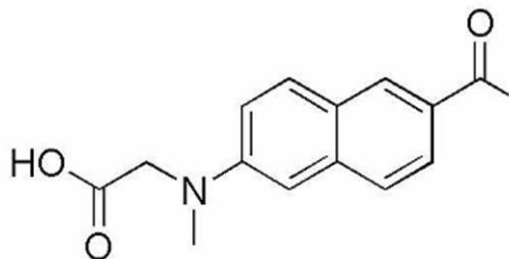
30

・・・ (1)

(式中、R は、H または $\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$ である。)

【0011】

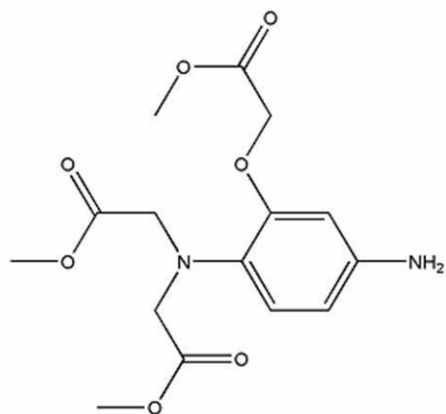
前記製造方法は、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド・HCl と、4-ジメチルアミノピリジンと、化学式 2 及び 3 で表わされる化合物とを反応させる段階を含む細胞内マグネシウムイオンのリアルタイムモニタリング用二光子励起蛍光プローブの製造方法を提供する。



40

(2)

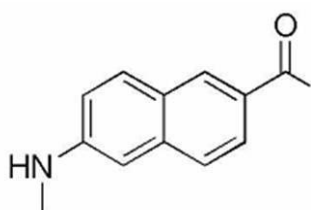
【0012】



(3)

【0013】

本発明の一実施形態によれば、前記化学式2で表わされる化合物は、メチルプロモアセテート、 Na_2HPO_4 、 NaI 及び化学式4で表わされる化合物を反応させて製造することができる。

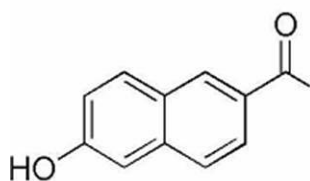


(4)

【0014】

本発明の更なる実施形態によれば、前記化学式4で表わされる化合物は、 $\text{CH}_3\text{NH}_2 \cdot \text{HCl}$ 、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 、 NaOH 、 H_2O 及び化学式5で表わされる化合物を反応させて製造することができる。

【0015】



(5)

【0016】

本発明の他の実施形態によれば、前記化学式5で表わされる化合物は、化学式6で表わされる化合物と共に HBr を反応させて製造することができる。

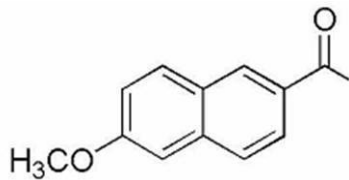
【0017】

10

20

30

40



(6)

【0018】

本発明は、前記第2の目的を達成するため、前記製造方法により製造した二光子励起蛍光プローブを観察対象となる細胞内に注入した後、該二光子励起プローブから放出される二光子励起蛍光をイメージ化する段階を含む細胞内マグネシウムのリアルタイムモニタリング方法を提供する。

10

【0019】

本発明の一実施形態によれば、前記二光子励起蛍光によるイメージは、500～620nmの範囲の波長を用いて得ることができる。

【0020】

本発明の更なる実施形態によれば、下記数式1を用いて細胞内マグネシウムイオンの濃度を定量的に測定することもできる。

【0021】

20

$$[Mg^{2+}] = K_d \left[(F - F_{min}) / (F_{max} - F) \right] \quad \dots (\text{数式1})$$

数式1において、 K_d は、本発明による二光子励起蛍光プローブのマグネシウムイオンに対する解離定数であり、 F は、測定された二光子蛍光強度であり、 F_{min} 及び F_{max} は、それぞれ最小蛍光強度及び最大蛍光強度である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0022】

以下、添付した図面及び実施形態を参照して、本発明をより詳細に説明する。

【0023】

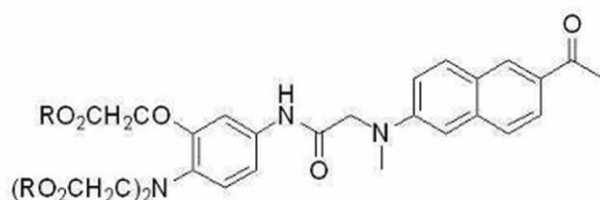
本発明による細胞内マグネシウムのリアルタイムモニタリング用二光子励起蛍光プローブは、二光子蛍光収率が非常に大きいため、細胞を染色する染料の量を顕著に減らすことができる。また、染料の分子量が小さく、細胞内への染色性が非常に優れているため、細胞内マグネシウムイオンのリアルタイムイメージングに適するという特性を有する。

30

【0024】

本発明は、具体的には、化学式1で表される細胞内マグネシウムのリアルタイムモニタリング用二光子励起蛍光プローブを提供する。

【0025】



(1)

(式中、Rは、Hまたは $CH_2OC(=O)CH_3$ である。)

【0026】

化学式1における2-アセチル-6-(ジメチルアミノ)ナフタレン部分は、二光子発

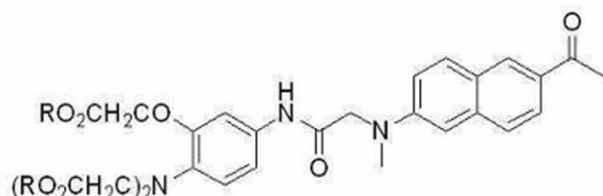
50

色団として機能し、*o*-アミノフェノール-N, N, *O*-トリ酢酸部分は、 Mg^{2+} に対する選択的結合部位として機能する。本発明による二光子励起蛍光プローブは、 Mg^{2+} と複合体を形成する場合に、強い二光子励起蛍光 (Two-Photon Excited Fluorescence: TPEF) を放出する。前記複合体は、溶媒環境の極性によって非常に異なる波長範囲の光を放出するために、相異なる検出ウインドウ (detection windows) を用いることで細胞膜-結合プローブと前記複合体とを容易に区分することができる。

【0027】

一方、化学式 1 で表わされる化合物において、R は、H または CH_2OCOCH_3 であり得るが、R が CH_2OCOCH_3 である場合、本発明による二光子励起蛍光プローブの細胞透過度をさらに向上させることができる。

10



(1)

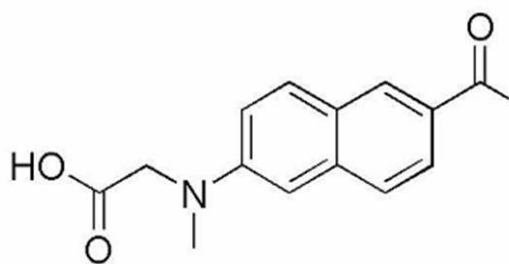
(式中、R は、H または CH_2OCOCH_3 である。)

20

【0028】

本発明はまた、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド・HCl と、4-ジメチルアミノピリジンと、化学式 2 及び化学式 3 で表わされる化合物とを反応させて化学式 1 で表わされる化合物を製造する段階を含む細胞内マグネシウムのリアルタイムモニタリング用二光子励起蛍光プローブの製造方法を提供する。

【0029】

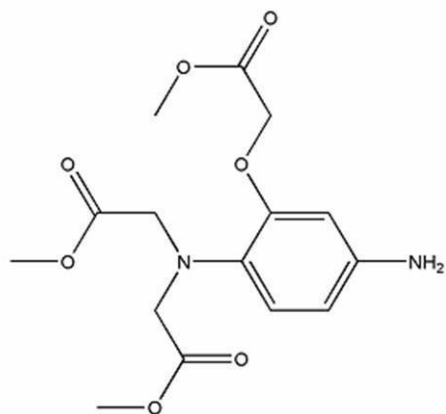


(2)

30

【0030】

40



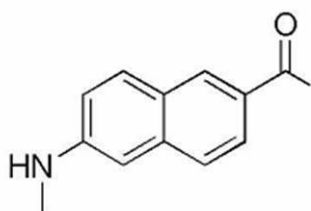
(3)

10

【0031】

望ましくは、化学式2で表わされる化合物は、化学式4で表わされる化合物、メチルプロモアセテート、 Na_2HPO_4 及び NaI を反応させて製造することができる。

【0032】



(4)

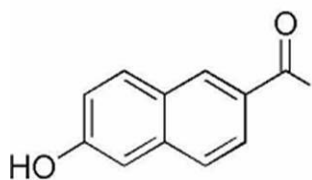
20

【0033】

望ましくは、化学式4で表わされる化合物は、化学式5で表わされる化合物、 $\text{CH}_3\text{NH}_2 \cdot \text{HCl}$ 、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 、 NaOH 及び H_2O とを反応させて製造することができる。

30

【0034】



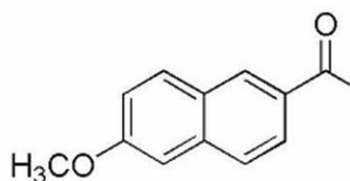
(5)

40

【0035】

また、化学式5で表わされる化合物は、化学式6で表わされる化合物と HBr とを反応させて製造することができる。

【0036】

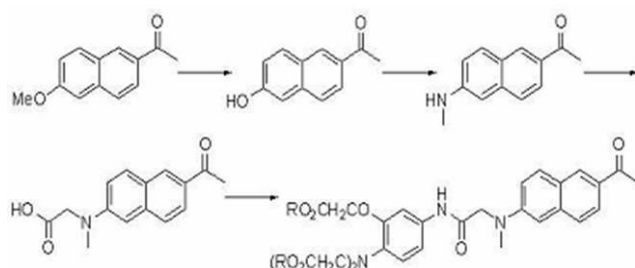


(6)

【 0 0 3 7 】

参考までに、下記反応式 1 には、化学式 6 で表わされる化合物から、化学式 1 で表わされる化合物を製造する典型的な反応を示す。

【 0 0 3 8 】



(反應式 1)

【 0 0 3 9 】

前述したように、細胞透過度の向上のために、反応式 1 の R は、H の代りに $\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$ に置換されうるが、望ましくは、このような置換過程は、R が H である化学式 1 で表わされる化合物とプロモ酢酸エチル及びトリエチルアミンとを反応させることで実行される。

【 0 0 4 0 】

一方、本発明は、また前記二光子励起蛍光プローブを観察対象となる細胞内に注入した後、該二光子励起蛍光プローブから放出される二光子励起蛍光をイメージ化する段階を含む細胞内マグネシウムのリアルタイムモニタリング方法を提供する。

【 0 0 4 1 】

特に、後述するように、前記二光子励起蛍光によるイメージを500~620nmの範囲の波長を用いて得る場合には、細胞膜に結合された二光子励起蛍光プローブによる発光寄与度を最小化しながら、細胞内に遊離状態で存在するMg²⁺イオンのみを選択的に測定することも可能である。

【 0 0 4 2 】

また、本発明による細胞内マグネシウムのリアルタイムモニタリング方法は、従来の技術とは異なって、細胞内マグネシウムの定性的分析だけでなく、これを定量的に測定することも可能であり、望ましくは、細胞内マグネシウムイオン濃度の測定は、下記数式 1 によって行われる。

【 0 0 4 3 】

$$[\text{Mg}^{2+}] = K_d \left[(F - F_{\text{min}}) / (F_{\text{max}} - F) \right] \quad \cdots (\text{数式 } 1)$$

数式 1 において、 K_d は、本発明による二光子励起蛍光プローブのマグネシウムイオンに対する解離定数であり、 F は、測定された二光子蛍光強度であり、 F_{min} 及び F_{max} は、それぞれ最小蛍光強度及び最大蛍光強度である。

【 0 0 4 4 】

以下、本発明を実施例を通じてより詳細に説明するが、下記実施例は、本発明の範囲を制限するためのものではなく、本発明の理解を助けるためのものとして記載されたもので

ある。

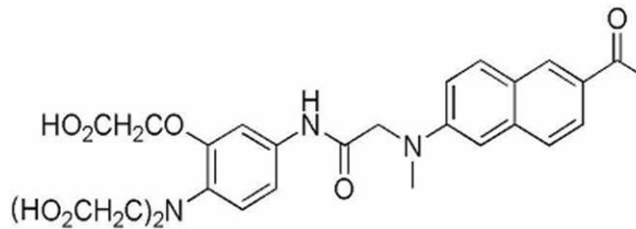
【実施例】

【0045】

〔製造例1〕 本発明による二光子励起蛍光プローブの製造

本製造例によって、二光子励起蛍光プローブである化学式7で表わされる化合物を製造した。

【0046】

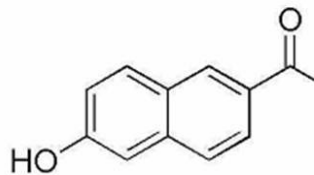


(7)

10

【0047】

〔製造例1.1〕 6-アセチル-2-ヒドロキシナフタレン（化学式8）の製造



(8)

20

【0048】

酢酸（100 mL）中の6-アセチル-2-メトキシナフタレン（10.4 g、52 mmol）溶液に、48%のHBr（43.0 g、0.53 mol）を添加し、混合物を得た。前記混合物を100℃で12時間攪拌した。過量の酢酸を真空乾固し、残留物を酢酸エチルに溶解させた後、希釈NaHCO₃及び塩水で洗浄した。これによって分離した有機層をMgSO₄で乾燥させ、真空中で溶媒を除去した。最終生成物は、酢酸エチル／ヘキサン（1：1）を溶離液として用いるカラムクロマトグラフィーによって精製した。

30

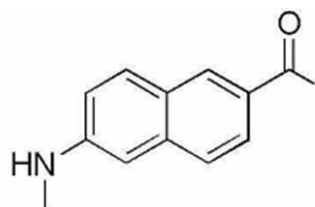
【0049】

収量7.2 g（74%）；融点173℃；IR（KBr）：3,362、1,664 cm⁻¹；¹H NMR（300 MHz、CDCl₃）：δ 8.41（d、1H、J=2 Hz）、7.99（dd、1H、J=9、J=2 Hz）、7.87（d、1H、J=9 Hz）、7.70（d、1H、J=9 Hz）、7.20（d、1H、J=2 Hz）、7.18（dd、1H、J=9、J=2 Hz）、5.70（br s、1H）、2.71（s、3 H）。Anal. Calcd. for C₁₂H₁₀O₂：C、77.40；H、5.41。Found：C、77.52；H、5.46。

40

【0050】

〔製造例1.2〕 6-アセチル-N-メチル-2-ナフチルアミン（化学式9）の製造



(9)

【0051】

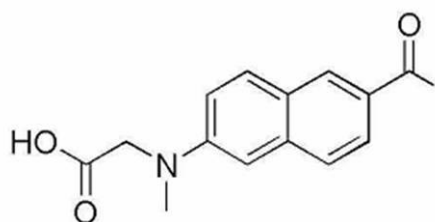
前記製造例1. 1で製造された化学式8で表わされる化合物(6. 5 g、35 mmol)、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (13. 3 g、70 mmol)、 NaOH (7. 0 g、0. 17 mol) 及び H_2O (200 mL) の混合物をスチールボム反応器(steel-bomb reactor)内に入れて $\text{MeNH}_2 \cdot \text{HCl}$ (14. 2 g、0. 17 mol) を添加して混合した後、該混合物を140℃で48時間攪拌した。得られた生成物を濾過によって収集し、水で洗浄した後、クロロホルム／酢酸エチル(50：1)を溶離液として用いるフラッシュカラムによって精製した。引き続き、メタノールを用いた再結晶によってさらに精製した。

【0052】

収量5. 9 g (85%) ; 融点181℃ ; IR (KBr) : 3, 347、1, 663 cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz、 CDCl_3) : d 8. 30 (d、1H、 $J=2\text{ Hz}$)、7. 93 (dd、1H、 $J=9$ 、 $J=2\text{ Hz}$)、7. 72 (d、1H、 $J=9\text{ Hz}$)、7. 63 (d、1H、 $J=9\text{ Hz}$)、6. 91 (dd、1H、 $J=9$ 、 $J=2\text{ Hz}$)、6. 77 (d、1H、 $J=2\text{ Hz}$)、4. 17 (br s、1H)、2. 97 (s、3H)、2. 67 (s、3H). Anal. Calcd. for $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{NO}$: C、78. 36 ; H、6. 58 ; N、7. 03. Found: C、78. 32 ; H、6. 56 ; N、7. 08。

【0053】

[製造例1. 3] 6-アセチル-2-[N-メチル-N-(カルボキシ)アミノ]ナフタレン(化学式10)の製造



(10)

【0054】

前記製造例1. 2で製造された化学式9で表わされる化合物(4. 5 g、23 mmol)、メチルプロモアセレート(5. 2 g、34 mmol)、 Na_2HPO_4 (4. 8 g、34 mmol) 及び NaI (1. 4 g、9. 2 mmol) の混合物を MeCN (150 mL) 中に入れて、 N_2 下で18時間還流させた。得られた生成物を酢酸エチルで抽出し、塩水で洗浄した後、クロロホルム／酢酸エチル(30：1)を溶離液として用いるフラッシュカラムによって精製し、中間体を得た。

【0055】

収量5. 2 g (83%) ; 融点92℃ ; IR (KBr) : 1, 754、1, 671 cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz、 CDCl_3) : d 8. 32 (d、1H、 $J=2\text{ Hz}$)、7. 92 (dd、1H、 $J=9$ 、 $J=2\text{ Hz}$)、7. 80 (d、1H、 $J=9\text{ Hz}$)、7. 64 (d、1H、 $J=9\text{ Hz}$)、7. 08 (dd、1H、 $J=9$ 、 $J=2\text{ Hz}$)、6. 88 (d、1H、 $J=2\text{ Hz}$)、4. 23 (s、2H)、3. 74 (s、3H)、3. 21 (s、3H)、2. 67 (s、3H) ; Anal. Calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$

$_{17}\text{NO}_3$: C、70.83 ; H、6.32 ; N、5.16. Found : C、70.88 ; H、6.35 ; N、5.10.

【0056】

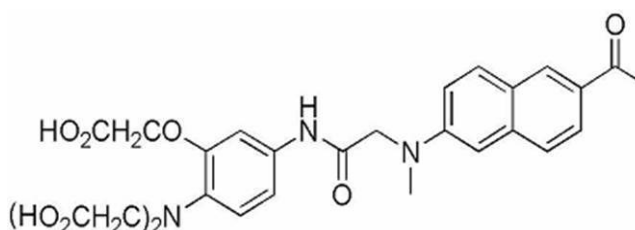
前記中間体 (2.0 g、7.4 mmol) 及び KOH (0.8 g、14 mmol) の混合物をエタノール/H₂O (50/10 mL) に入れて5時間攪拌した。得られた結果物である溶液を氷水 (100 mL) で希釈し、5℃未満の濃塩酸 (aq) を pH 3 までゆっくり添加した。結果物である沈澱を収集し、蒸留水で洗浄した後、メタノールを用いた再結晶によって精製した。

【0057】

収量 1.6 g (84%) ; 融点 158℃ ; IR (KBr) : 2,906、1,739、1,678 cm⁻¹ ; ¹H NMR (400 MHz、CD₃OD) : d 8.39 (d、1H、J=2 Hz)、7.86 (dd、1H、J=9、J=2 Hz)、7.84 (d、1H、J=9 Hz)、7.64 (d、1H、J=9 Hz)、7.18 (dd、1H、J=9、J=2 Hz)、6.93 (d、1H、J=2 Hz)、4.27 (s、2H)、3.19 (s、3H)、2.65 (s、3H) ; ¹³C NMR (100 MHz、CD₃OD) : d = 199.3、173.2、149.8、138.2、130.9、130.9、130.8、126.4、125.7、124.1、116.0、105.5、53.5、38.7、25.4 ppm ; Anal. Calcd. for C₁₅H₁₅NO₃ : C、70.02 ; H、5.88 ; N、5.44. Found : C、70.08 ; H、5.79 ; N、5.45.

【0058】

[製造例 1.4] 本発明による二光子励起蛍光プローブ (化学式 7) の製造

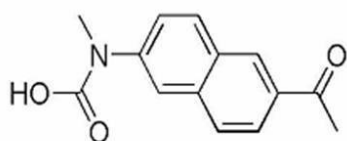


(7)

【0059】

前記製造例 1.3 で製造された化学式 10 で表わされる化合物 (0.50 g、1.9 mmol) 及び 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド・HCl (0.44 g、2.3 mmol) の混合物をジメチルホルムアミド (DMF) (20 mL) に入れて混合した後、20 分間攪拌した。攪拌後の前記混合物に、化学式 11 で表わされる化合物 (0.71 g、2.1 mmol) 及び 4-ジメチルアミノピリジン (0.033 g、0.29 mmol) を添加して N₂ 下で 12 時間攪拌した。下記化学式 11 で表わされる化合物は、公知の方法 (例えば、非特許文献 11 参照) で製造した。

【0060】



(11)

【0061】

攪拌後の生成物を酢酸エチルで抽出し、MgSO₄ 上で乾燥させた後、真空中で溶媒を除去した。最終生成物は、クロロホルム/酢酸エチル (1:1) を溶離液として用いるカラ

ムクロマトグラフィーによって精製した。メタノールを用いた再結晶によってさらに精製することで白色固体を得た。

【0062】

収量 0.64 g (58%) ; 融点 120℃ ; IR (KBr) : 3,264、1,754、1,663 cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) : d 8.35 (d、1H、 $J=2\text{ Hz}$)、8.15 (s、1H)、7.96 (dd、1H、 $J=9$ 、 $J=2\text{ Hz}$)、7.86 (d、1H、 $J=9\text{ Hz}$)、7.69 (d、1H、 $J=9\text{ Hz}$)、7.35 (d、1H、 $J=2\text{ Hz}$)、7.12 (dd、1H、 $J=9$ 、 $J=2\text{ Hz}$)、7.05 (d、1H、 $J=2\text{ Hz}$)、6.84 (d、1H、 $J=9\text{ Hz}$)、6.80 (dd、1H、 $J=9$ 、 $J=2\text{ Hz}$)、4.68 (s、2H)、4.16 (s、4H)、4.09 (s、2H)、3.77 (s、3H)、3.69 (s、6H)、3.22 (s、3H)、2.68 (s、3H) ; Anal. Calcd. for $\text{C}_{30}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_9$: C、62.17 ; H、5.74 ; N、7.25. Found : C、62.22 ; H、5.76 ; N、7.16。

【0063】

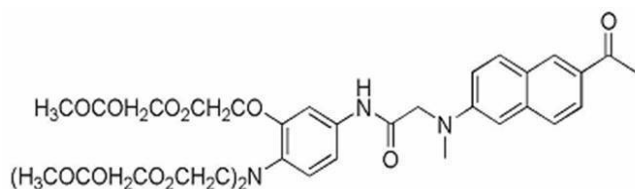
これによって得られたエステル (0.5 g、0.86 mmol) を前記製造例 1.3 に記載されたような方法によって加水分解した。前記加水分解の結果物である沈澱を収集し、蒸留水で洗浄した後、メタノール- CHCl_3 -石油エーテルからの結晶化によって精製した。

【0064】

収量 0.32 g (69%) ; 融点 148℃ ; IR (KBr) : 3,271、2,905、1,747、1,663 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) : d、8.38 (d、1H、 $J=2\text{ Hz}$)、7.84 (d、1H、 $J=9\text{ Hz}$)、7.83 (d、1H、 $J=9\text{ Hz}$)、7.63 (d、1H、 $J=9\text{ Hz}$)、7.22 (s、1H)、7.18 (dd、1H、 $J=9$ 、 $J=2\text{ Hz}$)、7.03 (dd、1H、 $J=9$ 、 $J=2\text{ Hz}$)、6.97 (d、1H、 $J=2\text{ Hz}$)、6.85 (d、1H、 $J=9.0\text{ Hz}$)、4.61 (s、2H)、4.22 (s、2H)、4.06 (s、4H)、3.20 (s、3H)、2.62 (s、3H) ; ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) : d=199.2、174.3、171.1、169.7、150.2、149.9、138.0、135.9、133.3、130.9、130.8、130.7、126.3、125.8、124.0、120.0、116.2、113.8、107.1、105.8、65.3、56.4、54.3、39.1、25.2 ppm ; Anal. Calcd. for $\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_9$: C、60.33 ; H、5.06 ; N、7.82. Found : C、60.31 ; H、5.12 ; N、7.78。

【0065】

[製造例 1.5] 本発明による二光子励起蛍光プローブ (化学式 12) の製造



(12)

【0066】

前記製造例 1.4 で製造された化学式 11 で表わされる化合物 (0.15 g、0.28 mmol)、ブロモメチルアセテート (0.34 g、2.2 mmol) 及び Et_3N (0.22 g、1.7 mmol) の混合物を CHCl_3 (5 ml) に入れて N_2 下で 15 時間攪拌した。真空中で溶液を除去し、粗生成物を酢酸エチル/ヘキサン (3:1) を溶離液として用いるカラムクロマトグラフィーによって精製した。引き続き、メタノールを用い

た再結晶によってさらに精製することで白色固体を得た。

【0067】

収量 0.12 g (58%) ; 融点 104 °C ; IR (KBr) : 3, 257, 1, 754, 1, 708, 1, 663 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) : d 8.35 (d, 1H, $J=2\text{ Hz}$)、8.18 (s, 1H)、7.97 (dd, 1H, $J=9$, $J=2\text{ Hz}$)、7.87 (d, 1H, $J=9\text{ Hz}$)、7.70 (d, 1H, $J=9\text{ Hz}$)、7.34 (d, 1H, $J=2\text{ Hz}$)、7.15 (dd, 1H, $J=9$, $J=2\text{ Hz}$)、7.05 (d, 1H, $J=2\text{ Hz}$)、6.89 (dd, 1H, $J=9$, $J=2\text{ Hz}$)、6.84 (d, 1H, $J=9\text{ Hz}$)、5.80 (s, 2H)、5.75 (s, 4H)、4.71 (s, 2H)、4.18 (s, 4H)、4.09 (s, 2H)、3.23 (s, 3H)、2.66 (s, 3H)、2.09 (s, 6H)、2.07 (s, 3H) ; ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) : d=197.9, 170.1, 169.7, 169.7, 168.0, 167.7, 150.1, 149.2, 137.3, 135.9, 133.0, 132.4, 131.6, 130.3, 127.0, 126.7, 125.3, 121.0, 116.7, 114.1, 107.8, 107.7, 79.5, 77.4, 65.9, 59.6, 53.7, 40.4, 26.7, 20.9, 20.8 ppm ; Anal. Calcd. for $\text{C}_{36}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_{15}$: C, 57.37 ; H, 5.22 ; N, 5.58. Found : C, 57.32 ; H, 5.31 ; N, 5.52.

【0068】

[実施例1] 吸光スペクトル測定

上述したように製造された化学式13で表わされる化合物に対する吸光スペクトルを Hewlett-Packard 8453 ダイオード整列スペクトロメーター上で測定し、蛍光スペクトルを、1 cm 標準石英セルを備えた Amico-Bowman series 2 発光スペクトロメーターを用いて測定した。蛍光量子収率は、公知の方法（例えば、非特許文献12 参照）によって、Coumarin 307 を用いて測定した。

【0069】

図1は、化学式13で表わされる化合物の一光子吸収及び発光スペクトルである。多様な溶媒中における化学式13で表わされる化合物の最大発光波長 ($\lambda_{\text{max}}^{(1)}$) 及び最大蛍光波長 ($\lambda_{\text{max}}^{f1}$) を表1に示す。

【0070】

【表1】

化合物	溶媒 (E_T^N) *	$\lambda_{\text{max}}^{(1)}$ (nm)	$\lambda_{\text{max}}^{f1}$ (nm)
化学式13	1, 4-ジオキサン (0.164)	344	413
	DMF (0.386)	356	441
	エタノール (0.654)	359	473
	H_2O (1.000)	363	495

*: カッコ内の数値は、溶媒極性に対する正規化された経験的パラメータである(非特許文献13 参照)。

【0071】

図1 (a)、(b) 及び表1 から分かるように、溶媒極性が増加するにつれて大きな色移動が観察されるという点は、本発明による化合物が極性プローブとして非常に有用であるということを示唆する。

【0072】

[実施例2] Mg^{2+} 濃度変化による吸光度変化測定

図2 (a) 及び図2 (b) は、化学式7で表わされる化合物の Mg^{2+} 濃度変化に対するスペクトル反応を示すグラフである。図2 (a) から分かるように、Tris バッファ溶液 (10 mM、pH 7.05) 中の化学式7で表わされる化合物に Mg^{2+} を添加した

時、吸収スペクトルには軽微な変化が観察された。これとは対照的に、 Mg^{2+} 濃度が増加するにつれて蛍光度は急激に増加した（図2（b））。これはおそらく、金属イオン複合体による光誘起電子移動（PET）過程が遮断されるためである。 100 mM Mg^{2+} の存在下で、蛍光度向上因子は、17個観測された。

【0073】

一方、ほぼ同一の結果が二光子過程に対しても観察された。図2（c）は、多様な濃度の MgCl_2 （0～100 mM）存在下での二光子蛍光スペクトルである。さらに、図3（a）乃至図3（c）には、 Ca^{2+} （0～1000 μM ）存在下での化学式7で表わされる化合物に対する一光子吸収スペクトル（図3（a））、発光スペクトル（図3（b））及び二光子蛍光スペクトル（図3（c））をそれぞれ図示した。

10

【0074】

〔実施例3〕ベネシーヒルデブランドプロット（Benesi-Hildebrand Plot）

化学式7で表わされる化合物の Mg^{2+} 及び Ca^{2+} に対する複合体形態は、ベネシーヒルデブランドプロット分析法（非特許文献14参照）によって決定した。蛍光変化は、化学式7で表わされる化合物（L）と金属イオン（M）との間の1：1複合体形成によってのみ誘導されるという前提下で、総プローブ濃度及び蛍光強度は、 $[L]_0 = [L] + [LM]$ 及び $F = \phi_L [L] + \phi_{ML} [ML]$ と定義される。ここで、 $[L]_0$ 及び $[M]_0$ はそれぞれ総濃度であり、 $[L]$ 及び $[LM]$ はそれぞれL及びMの平衡濃度であり、 ϕ_L 及び ϕ_{ML} は遊離形態（free forms）及び複合形態の化学式7で表わされる化合物に対する蛍光量子収率である。もし、 $[M]_0$ が $[L]_0$ より格段に大きい値を有すれば、ベネシーヒルデブランド式は、下記数式2で表わすことができる。

20

$$\frac{1}{F - F_{\text{min}}} = \frac{1}{(\phi_{ML} - \phi_L)[L]_0} + \frac{1}{K[L]_0(\phi_{ML} - \phi_L)[M]_0}$$

・・・（数式2）

30

【0076】

化学式7で表わされる化合物と金属イオンとの間で、1：1の金属とプローブとの複合体が形成されるならば、数式2によるデータのベネシーヒルデブランドプロットは線形となる（非特許文献15参照）。図4（a）及び図4（b）は、それぞれ化学式7で表わされる化合物の Mg^{2+} 及び Ca^{2+} に対する結合において、 $1 / (F - F_{\text{min}})$ vs $1 / [\text{Mg}^{2+}]$ のプロットである。前記プロットが線形であることから、1：1複合体が形成されるということが分かる。

【0077】

〔実施例4〕解離定数の決定

pH 7.05である24℃、100 mM KCl及び20 mM NaClの溶液中の Mg^{2+} －EGTAに対する解離定数（ K_d ）を、WinMAXC（C. Patton, Stanford University, Palo Alto, CA）プログラムを用いて計算し、計算値は略28 mMであった。前記溶液中の遊離 $[\text{Mg}^{2+}]$ 水準は、 $K_d = 28\text{ mM}$ である Mg^{2+} －EGTA緩衝溶液によって調節した（非特許文献16参照）。

40

【0078】

Mg^{2+} －化学式7で表わされる化合物複合体に対する K_d を決定するために、24℃でHClを用いてpHを7.05に調整した、10 mM Tris、100 mM KCl、20 mM NaCl及び1 mM EGTAからなる溶液3.0 mL中に、化学式7で表わされる化合物2 μM を添加した後、蛍光スペクトルを記録した。引き続き、前記溶液1.5 μL を廃棄し、化学式7で表わされる化合物2 μM 、103.6 mMの MgCl_2 、

50

4. 6 mMのEGTA及び10 mMのTrisを含み、pHが7.05である溶液1.5 μ lと置き換えた後、スペクトルを記録した。

【0079】

前者の溶液は1 mMの遊離EGTAを含むが、後者の溶液は100 mMの遊離 Mg^{2+} を含むため、99.95 : 0.05 (v/v)の混合により、0.05 mM遊離 Mg^{2+} の溶液となった。

【0080】

さらに、0.05 mM遊離 Mg^{2+} となった溶液に対して、同様に1.5 μ l、3.0 μ l、6.0 μ l、6.0 μ l、6.0 μ l、6.5 μ l、15 μ l、15 μ l、61 μ l、63 μ l、128 μ l、365 μ l、420 μ l及び970 μ lの順に該溶液を廃棄し、該廃棄と同量の高 Mg^{2+} 濃度溶液と置き換えることによって、0.1 mM、0.2 mM、0.4 mM、0.6 mM、0.8 mM、1.0 mM、1.5 mM、2.0 mM、4.0 mM、6.0 mM、10 mM、21 mM、32 mM及び54 mMの遊離 Mg^{2+} の溶液を得た。

【0081】

100 mM KCl及び30 mM MOPS中のpH7.2での Ca^{2+} -EGTAに対する解離定数(K_d)は、前述したように計算し、その値は略144 nMであった。多様な $[Ca^{2+}]$ を含む一連の補正溶液(calibration solutions)は、2種類の溶液(10 mM K_2 EGTAを含む溶液A及び10 mM CaEGTAを含む溶液B)を多様な比率で混合することによって得た。但し、50~1000 mM濃度は $CaCl_2$ を添加することによって得た(非特許文献17、非特許文献18、非特許文献19、非特許文献20参照)。2種類の溶液は共に100 mM KCl及び30 mM MOPSを含み、pH7.2となるように調整された。

【0082】

化学式7で表わされる化合物と Mg^{2+} との間に1 : 1金属-リガンド複合体が形成される場合、その平衡状態は下記数式3で表される。

$$[LM]^2 - ([L]_0 + [M]_0 + K_d)[LM] + [L]_0[M]_0 = 0$$

・・・(数式3)

【0083】

ここでL及びMは、それぞれ化学式7で表わされる化合物及び Mg^{2+} である。

【0084】

総プローブ及び金属イオン濃度は、それぞれ $[L]_0 = [L] + [LM]$ 及び $[M]_0 = [M] + [LM]$ と定義され、 $[L]_0$ 及び $[M]_0$ の値が与えられる場合に K_d は、下記数式4または数式5で表わされる。

【0085】

$$[LM] = \frac{([L]_0 + [M]_0 + K_d) - \sqrt{([L]_0 + [M]_0 + K_d)^2 - 4[L]_0[M]_0}}{2}$$

・・・(数式4)

【0086】

$$(F - F_{\min}) = \left(\frac{([L]_0 + [M]_0 + K_d) - \sqrt{([L]_0 + [M]_0 + K_d)^2 - 4[L]_0[M]_0}}{2[L]_0} \right) (F_{\max} - F_{\min})$$

・・・(数式5)

【0087】

10

ここで、Fは、測定された蛍光強度であり、 $F_{\min}$ は、最小蛍光強度であり、 $F_{\max}$ は、最大蛍光強度である。数式5による適正曲線（図5（a））に最もよく符合される K_d 数値を商用のエクセルプログラムによって計算した（非特許文献21、非特許文献22参照）。

【0088】

また、二光子過程に対する K_d 数値を決定するために、780nmの波長及び1230mWの出力に設定し（焦点平面からおおよそ10mWに該当）、モードロックされたチタニウムサファイアレーザー光源（Coherent Chameleon、90MHz、200fs）によって励起されるDMIRE2 Microscope（Leica）を用いてTPEFスペクトルを得た。TPEF適正曲線（図5（b））を得て、これを数式5に近似した。

20

【0089】

前述した過程によって Mg^{2+} 及び Ca^{2+} に対する一光子過程における解離定数を測定した結果、それぞれ 1.4 ± 0.1 mM及び 9.0 ± 0.3 mMである。これは Mg^{2+} 及び Ca^{2+} に対する二光子過程における解離定数である 1.6 ± 0.1 mM及び 11 ± 1 mMと非常に類似した数値であった。この結果は、一光子過程及び二光子過程の両過程において、結合が進行する類似したメカニズムが作動するということを意味する。

【0090】

〔実施例5〕 金属陽イオンに対する選択性測定

図6（a）は、化学式7で表わされる化合物の他の金属陽イオンに対する選択性を表わす図である。化学式7で表わされる化合物は、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 及び Mn^{2+} に対しては中～強反応を示すが、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 及び Co^{2+} に対しては遥かに弱い反応を示す。化学式7で表わされる化合物の金属イオン選択性は、既存のMgG及びMag-Fura-2（非特許文献23参照）に対して報告されたものと類似したものである。

30

【0091】

一方、遊離 Mg^{2+} の細胞内濃度（0.1～6.0mM）は、 Ca^{2+} の細胞内濃度（10nM～1μM）より遥かに高く、キレート化可能な Zn^{2+} は、特定領域を除いて存在しないために、前記化学式7で表わされる化合物は、 Ca^{2+} 及び Zn^{2+} による干渉なしに Mg^{2+} を検出することができる。さらに、図6（b）で示すように、化学式7で表わされる化合物及び化学式7で表わされる化合物-Mg²⁺は、生物学的に関連性あるpH範囲内でpH変化に敏感ではないという特性を有する。

40

【0092】

〔実施例6〕 常用プローブとの二光子スペクトル特性比較

緩衝溶液中の化学式7で表わされる化合物、MgG及びMag-fura-2と、 Mg^{2+} との複合体に対する二光子スペクトル特性を図7に比較して図示し、下記表2には各プローブに対する蛍光物理学的特性を列挙した。

【0093】

【表 2】

化合物 ¹⁾	$\lambda_{\text{max}}^{(1)}$ (nm) ²⁾	$\lambda_{\text{max}}^{(\text{fl})}$ (nm) ²⁾	$\lambda_{\text{max}}^{(2)}$ (nm) ³⁾	ϕ ⁴⁾	d_{max} ⁵⁾	ϕd ⁶⁾
化学式13	360	495	ND ⁷⁾	0.07 ⁸⁾	ND ⁷⁾	ND ⁷⁾
化学式7	365	498	ND ⁷⁾	0.04	ND ⁷⁾	ND ⁷⁾
化学式7-Mg ²⁺	365	498	780	0.58	215	125
Mg-fura-2-Mg ²⁺	330 ⁹⁾	491 ⁹⁾	780	0.30 ⁹⁾	56	17
Mg-G-Mg ²⁺	506 ⁹⁾	532 ⁹⁾	800	0.42 ⁹⁾	37	16

【0094】

1) すべてのデータは、10mM Tris緩衝溶液中から(100mM KCl、20mM NaCl、1mM EGTA、pH7.05)、50mMのMgCl₂・6H₂O存在下及び不存在下で測定された。

【0095】

2) 一光子吸収及び発光スペクトルの λ_{max}

3) 二光子励起スペクトルの λ_{max}

4) 蛍光量子収率、±10%

5) 10⁻⁵0cm⁴s/光子(GM)中のピーク二光子断面、±15%

6) 二光子活動断面

7) 不検出。二光子励起蛍光強度が余りにも微弱であり断面を正確に測定できない。

【0096】

8) DMF中において、 $\phi = 0.32 \pm 0.02$

9) 非特許文献24参照

図7及び表2の結果から、従来の通常的なプローブよりも、本発明による化合物を用いる場合に、さらに明るいTPMイメージが得られることが分かる。

【0097】

〔実施例7〕本発明による二光子励起蛍光プローブを用いた細胞観察

Hep3B細胞をペニシリン/ストレプトマイシン及び10%ウシ胎児血清(FBS)を添加したDulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)中で培養した。前記培養は、37℃CO₂インキュベータ中で行った。Hep3B細胞は、無血清培地で3回洗浄され、その後、化学式13で表わされる化合物-Mg²⁺複合体2μMと共に、37℃で30分間、無血清培地中で培養された。前記Hep3B細胞を無血清培地で3回洗浄し、無血清培地中で15分間さらに培養した後、観察した。

【0098】

化学式13で表わされる化合物で標識されたHep3B細胞の二光子蛍光顕微鏡イメージは、×100オイル物体、穿孔数(NA)=1.30を有するスペクトル共焦点及び多光子顕微鏡(Leica TCS SP2)を用いて得た。二光子蛍光顕微鏡イメージは、モードロックされたチタン-サファイアレーザー光源(Coherent Chameleon、90MHz、200fs)として波長780nmでプローブを励起させることで得た。360~620nm、360~460nm及び500~620nmの範囲の波長でイメージを得るために、信号を400Hzスキャン速度で9ビット、512×512ピクセルとして収集するために内部PMTが用いられた。

【0099】

図8(a)乃至図8(c)は、化学式13で表わされる化合物で標識されたHep3B細胞のTPMイメージである。Tris緩衝溶液中の化学式7で表わされる化合物-Mg²⁺の蛍光量子収率($\phi = 0.58$)及びDMF中の化学式13で表わされる化合物の蛍

10

20

30

40

50

光量子収率 ($\phi = 0.32$) は、T r i s 緩衝溶液中の化学式 7 で表わされる化合物の蛍光量子収率 ($\phi = 0.04$) 及び化学式 13 で表わされる化合物の蛍光量子収率 ($\phi = 0.07$) より遥かに大きいため (表 2)、細胞から発光された T P E F は、大部分が細胞内の化学式 7 で表わされる化合物-Mg²⁺ 複合体または細胞膜結合プローブに起因したものである。DMF 中の化学式 13 で表わされる化合物は、後者に対する立派なモデルであり、これは λ_{max}^{f1} 数値が類似しているためである (図 8 (d) 参照)。このような説明に対する追加的な証拠は、2 mM エチレンジアミンテトラ酢酸存在下の 10 μ M カルシマイシン処理後に化学式 13 で表わされる化合物-Hep3B 細胞から放出される無視できるほどの T P E F によって示され、前記 T P E F は、100 mM MgCl₂ 存在下の 10 μ M カルシマイシン処理によって増加する。さらに、360~620 nm の範囲の波長で収集されたイメージは、集中地点 (intense spot) 及び明るい部位を表わし、このとき、T P E F 最大値は、 $\lambda = 440$ nm (符号 21 で示す線) 及び 498 nm (符号 22 で示す線) で表われる (図 8 (d))。

【0100】

表 2 から分かるように、T r i s 緩衝溶液中で測定された発光スペクトルと比べると、青色バンドは顕著に青色へ移動されたが、赤色バンドはほぼ同一であった。2 種類のスペクトルは、それぞれ、439 nm (図 8 (d) の符号 23 で示す線) 及び 488 nm (図 8 (d) の符号 24 で示す線)、426 nm (図 8 (d) の符号 25 で示す線) 及び 498 nm (図 8 (d) の符号 26 で示す線) で最大値を有する 2 種類のガウス関数 (Gaussian functions) で近似することができる。分離されたスペクトルのピーク位置は類似しており、これはプローブが異なる極性を有して 2 種類の領域に存在することができるということを意味する。さらに、集中地点は、励起状態の寿命が 3.3 ns であり、これは 2.2 ns に集中された寿命分布曲線の最上端より遥かに長いものである。このような結果から、本発明によるプローブは 2 種類の相異なる環境中に存在し、このうちさらに極性が強いものは細胞内に (短寿命を有する赤色発光)、極性が弱いものは細胞膜に結合されて (長寿命を有する青色発光) 存在することが推測できる。

【0101】

本発明による二光子励起蛍光プローブを用いる場合、細胞膜結合プローブから起因する誤差は、細胞内の化学式 7 で表わされる化合物-Mg²⁺ 複合体からの T P E F を測定することにより最小化することができる。図 8 (d) に示すように、分離されたガウス関数中で短波長バンド (符号 23 で示す線) は、 λ が 500 nm で基線にまで減少する。従って、細胞膜結合プローブから発光された T P E F は $\lambda > 500$ nm では無視できるほどである。一方、DMF 中の化学式 13 で表わされる化合物をモデルとして用いる場合には、500 nm を超える発光バンドの尾部分は誤差を誘発することもあるが、 $\lambda > 500$ nm での尾部分領域は、全体発光バンドの約 5 % であるため、重要な考慮事項にならない。結果的に、500~620 nm で収集された T P E F イメージは、均等に分布する一方、短波長である 360~460 nm を用いて収集された T P E F イメージは集中地点を見せる。従って、500~620 nm 範囲の波長を用いる場合には、細胞膜結合プローブによる寄与度を最小化しながら Mg²⁺ イオンを測定することができる。

【0102】

[実施例 8] 細胞内遊離 Mg²⁺ イオン濃度の測定

休止状態の細胞内遊離 Mg²⁺ イオン濃度を下記数式 1 によって測定した。

【0103】

$$[Mg^{2+}] = K_d \left[\frac{(F - F_{min})}{(F_{max} - F)} \right] \dots (\text{数式 1})$$

ここで、K_d は、本発明による二光子励起蛍光プローブとマグネシウムイオンとの解離定数であり、F は、測定された二光子蛍光強度であり、F_{min} 及び F_{max} は、それぞれ最小蛍光強度及び最大蛍光強度である。

【0104】

最小蛍光強度 (F_{min}) の測定は、2 mM の EDTA 存在下で 10 μ M カルシマイシンを用いて細胞内 Mg²⁺ を枯渇させることで決定し、最大蛍光強度 (F_{max}) は、1

10

20

30

40

50

0.0 mM $MgCl_2$ 存在下で 10 μM カルシマイシンを用いて測定した（非特許文献 25、非特許文献 26 参照）。

【0105】

図 9 (a) 乃至図 9 (c) は、それぞれ、化学式 13 で表わされる化合物（2 μM ）で標識された H e p 3 B 細胞の二光子蛍光イメージ（F の測定、図 9 (a)）、2 mM の EDTA 存在下で 10 μM カルシマイシンを処理した後、化学式 13 で表わされる化合物（2 μM ）に標識された H e p 3 B 細胞の二光子蛍光イメージ（ F_{min} の測定、図 9 (b)）、及び 100 mM $MgCl_2$ 存在下で 10 μM カルシマイシンを処理した後、化学式 13 で表わされる化合物（2 μM ）に標識された H e p 3 B 細胞の二光子蛍光イメージ（ F_{max} の測定、図 9 (c)）である。

10

【0106】

休止状態の H e p 3 B 細胞において、測定された細胞内ガラス Mg^{2+} イオンの濃度は、 0.65 ± 0.10 mM であり、このような数値は、既存文献に報告されたものとよく一致する値である（例えば、非特許文献 27、非特許文献 28 参照）。

【0107】

近年開発されたプローブである 2, 3-ジシアノヒドロキノン（DCHQ）を用いて TPM によって細胞内マグネシウムイオンを定性的に分析した結果は報告されている（非特許文献 29 参照）。しかしながら、TPM による細胞内遊離 Mg^{2+} の定量的な測定は、本発明が最初の例である。

【0108】

20

〔実施例 9〕マウス海馬スライスのイメージ化

本発明による二光子励起蛍光プローブが組織の深層観察に有用であるという点を立証するために、生後 3 日のマウスから得た海馬スライスを 37℃ で 30 分間 5 μM の化学式 13 で表わされる化合物と共に培養した。図 10 (a) は、新生児マウスの海馬スライスの明背景イメージ (brightfield image) であり、歯状回同様に、CA1 及び CA3 領域の拡大図である（10 倍）。図 10 (b) は、同一の倍率の TPM イメージであり、100 ~ 300 μm の深さで、同一領域に Mg^{2+} が分布することが分かる。一方、前記 CA3 領域の場合、 Zn^{2+} が発光に寄与した可能性を排除することはできないが、同一の領域をさらに高い倍率で観察した図 10 (c) 及び図 10 (d) を参照すれば、CA1 領域の錐体ニューロン層で Mg^{2+} 分布が観察され、このような領域には、 Zn^{2+} がほとんど存在しないという点を勘案すれば、本発明による二光子励起蛍光プローブが Mg^{2+} に対して高い選択性を有するということが分かる。さらに、図 10 (d) を参照すれば、本発明による二光子励起蛍光プローブは、深層組織内部の核に存在する Mg^{2+} までも探知することができるという点が見える。

30

【0109】

本発明による二光子励起蛍光プローブは、上述した装置によると、細胞内マグネシウムイオンのリアルタイムイメージングに非常に適する。これは Mg^{2+} に対する二光子励起蛍光 (TPEF) において、17 倍以上の向上効果を示し、これは従来の通常的なプローブに比べて 7 倍以上の高い数値である。従って、細胞を染色する染料の量を顕著に減らすことができる。また、染料の分子量が小さくて細胞内への染色性に非常に優れ、深層組織内部に存在する Mg^{2+} のモニタリングにも非常に適し、細胞内 Mg^{2+} を定性的だけでなく、定量的にも測定できるという効果がある。

40

【図面の簡単な説明】

【0110】

【図 1】本発明による二光子励起蛍光プローブに対する一光子吸収スペクトル (a) 及び発光スペクトル (b) を測定した結果を示すグラフ。

【図 2】本発明による二光子励起蛍光プローブの Mg^{2+} 濃度変化に対する一光子吸収スペクトル (a)、発光スペクトル (b) 及び二光子蛍光スペクトル (c) のグラフ。

【図 3】本発明による二光子励起蛍光プローブの Ca^{2+} 濃度変化に対する一光子吸収スペクトル (a)、発光スペクトル (b) 及び二光子蛍光スペクトル (c) を示すグラフ。

50

【図4】それぞれ本発明による二光子励起蛍光プローブの Mg^{2+} (a) 及び Ca^{2+} (b) に対する結合において、 $1/(F-F_{max})$ vs $1/[Mg^{2+}]$ のプロットを示すグラフ。

【図5】本発明による細胞内マグネシウムのリアルタイムモニタリング方法において、数式5による適正曲線を示すグラフ (a) 及び二光子励起蛍光適正曲線 (b) を示すグラフ。

【図6】本発明による二光子励起蛍光プローブの Mg^{2+} 以外の他の金属陽イオンに対する選択性 (a)、及びpH変化による蛍光強度 (b) を示すグラフ。

【図7】本発明による二光子励起蛍光プローブと Mg^{2+} との複合体及び従来技術によるプローブと Mg^{2+} との複合体に対する二光子スペクトル特性を比較図示した図面。

10

【図8】Hep3B細胞を本発明による二光子励起蛍光プローブに標識した後、360～620nm (a)、360～460nm (b) 及び500～620nm (c) の波長を用いて得た二光子顕微鏡写真。

【図9】それぞれ本発明による二光子励起蛍光プローブに標識されたHep3B細胞の二光子蛍光イメージ (a)、2mMのEDTA存在下で10 μ Mカルシマイシンを処理した後、本発明による二光子励起蛍光プローブに標識されたHep3B細胞の二光子蛍光イメージ (b) 及び100mM $MgCl_2$ 存在下で10 μ Mカルシマイシンを処理した後、本発明による二光子励起蛍光プローブに標識されたHep3B細胞の二光子蛍光イメージ (c)。

【図10】新生児マウスの海馬スライスを本発明による二光子励起蛍光プローブで染色した後観察した10倍倍率の明背景イメージ (a)、10倍倍率の二光子顕微鏡観察写真 (b)、40倍倍率の二光子顕微鏡観察写真 (c) 及び100倍倍率の二光子顕微鏡観察写真 (d)。

20

【図 1】

FIG.1 (a)

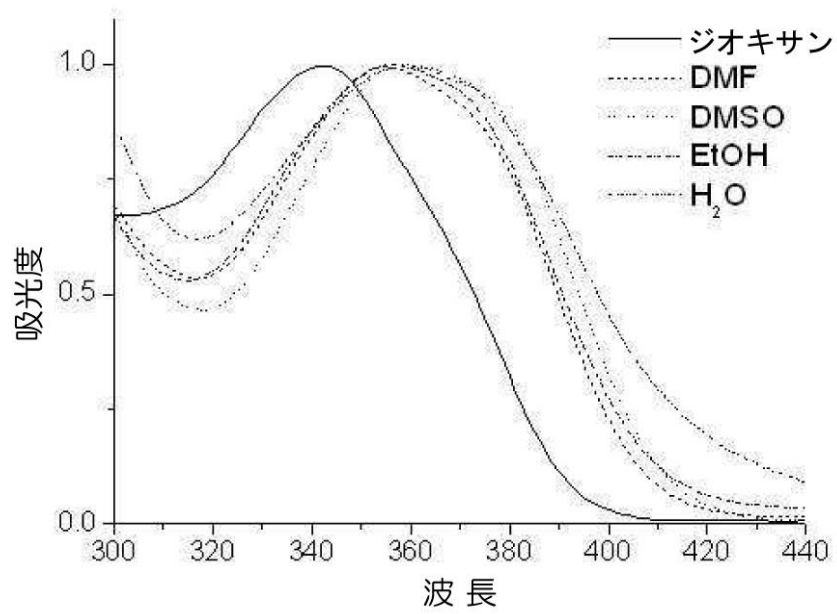
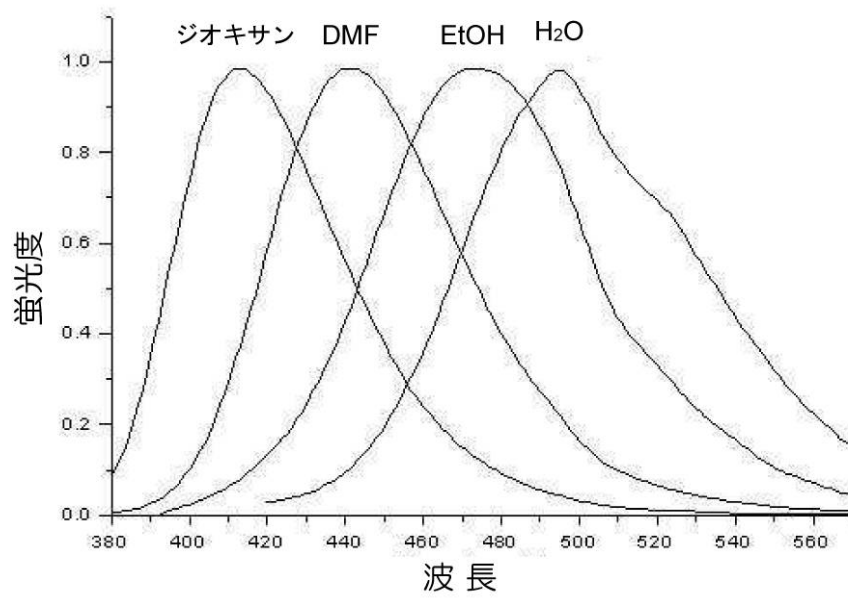


FIG.1 (b)



【図 2】

FIG.2 (a)

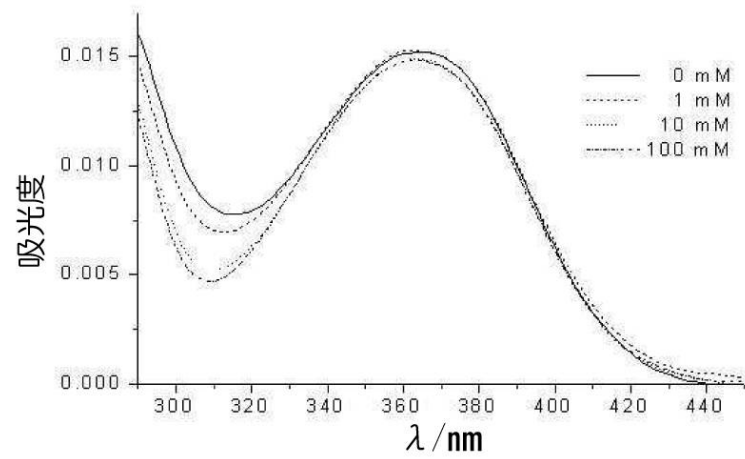


FIG.2 (b)

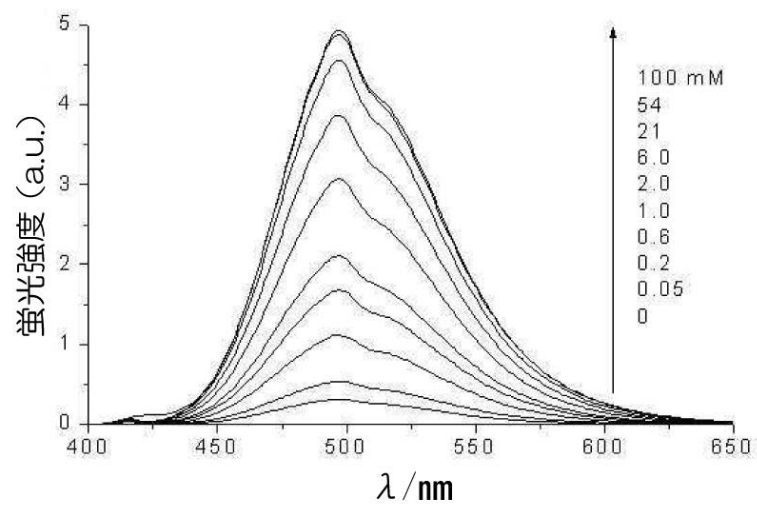
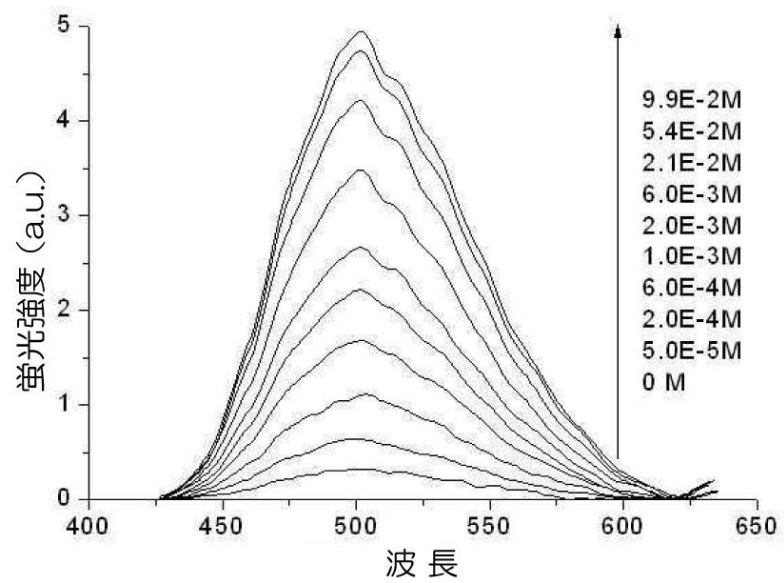


FIG.2 (c)



【図 3】

FIG.3 (a)

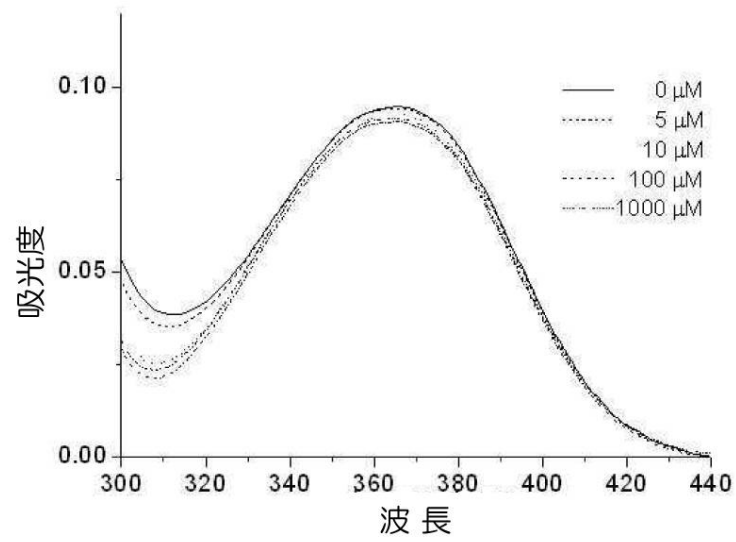


FIG.3 (b)

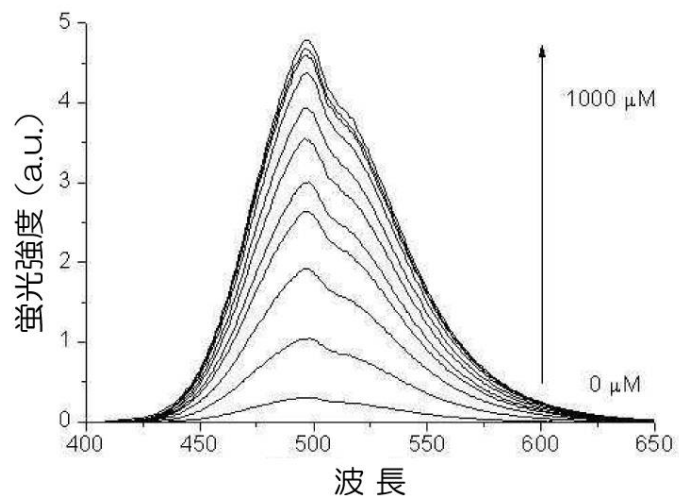
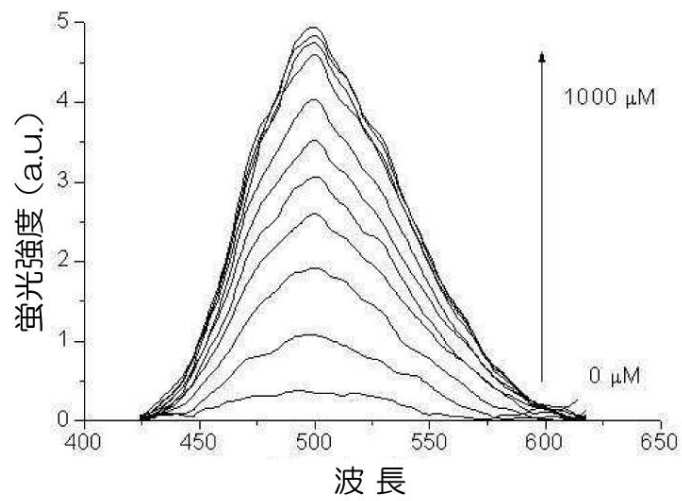


FIG.3 (c)



【図 4】

FIG.4 (a)

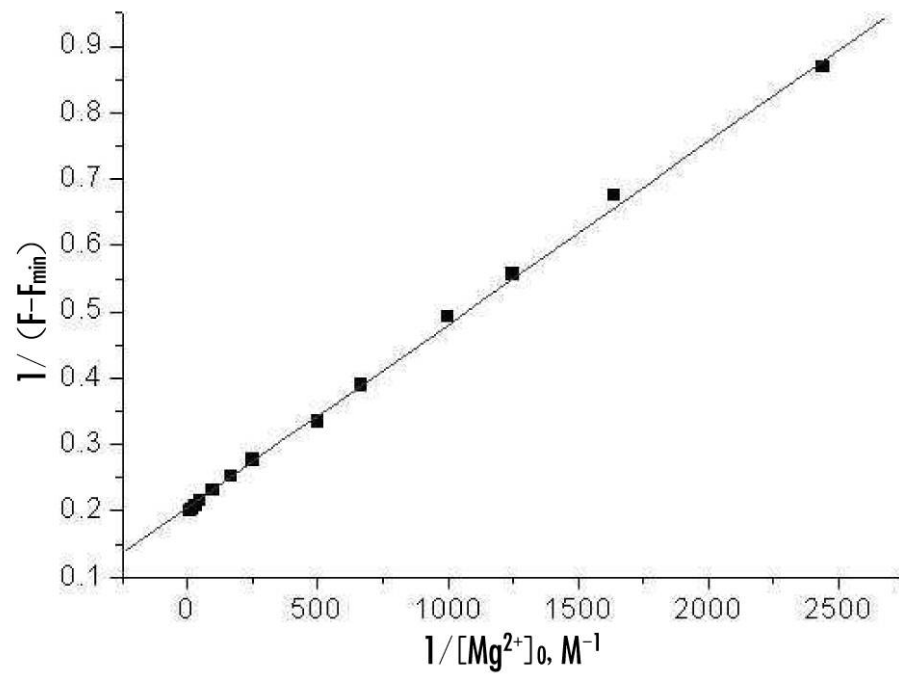
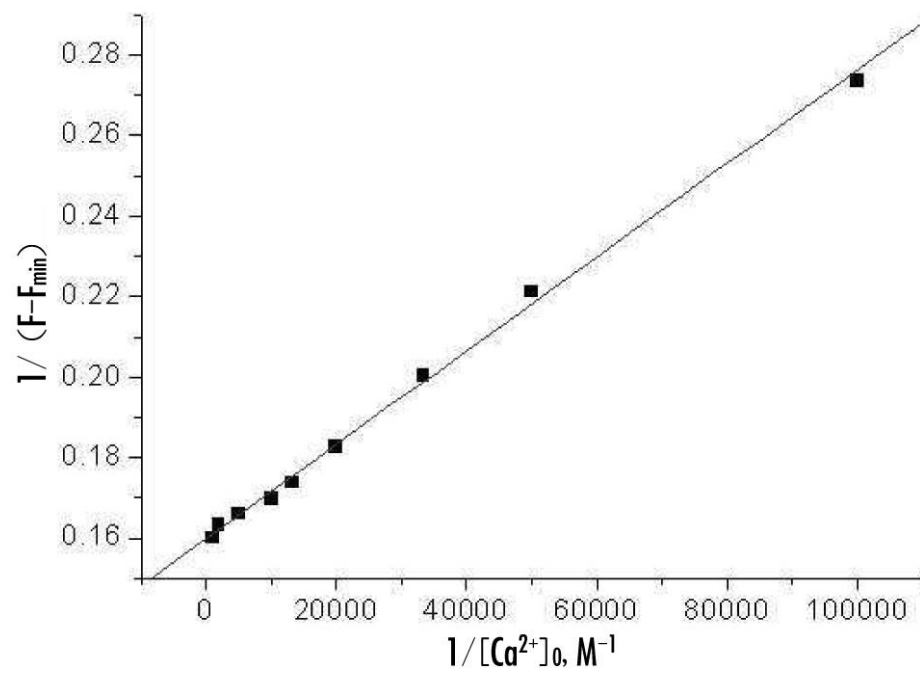


FIG.4 (b)



【図 5】

FIG.5 (a)

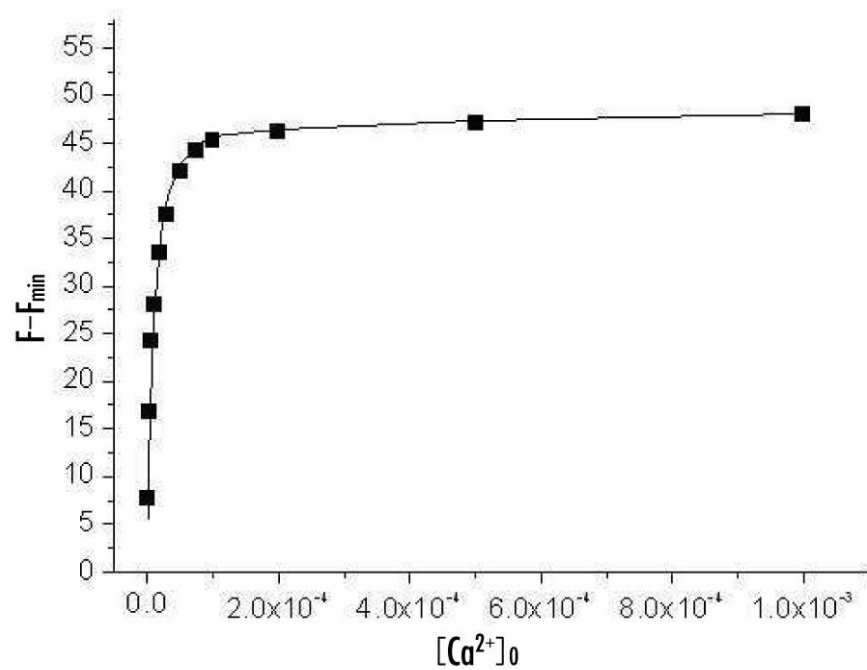
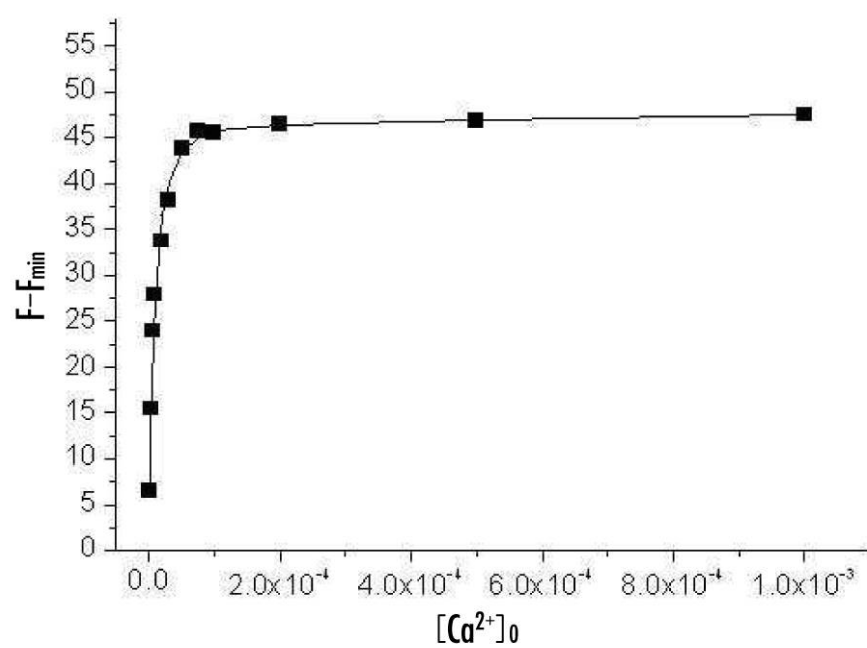


FIG.5 (b)



【図 6】

FIG.6 (a)

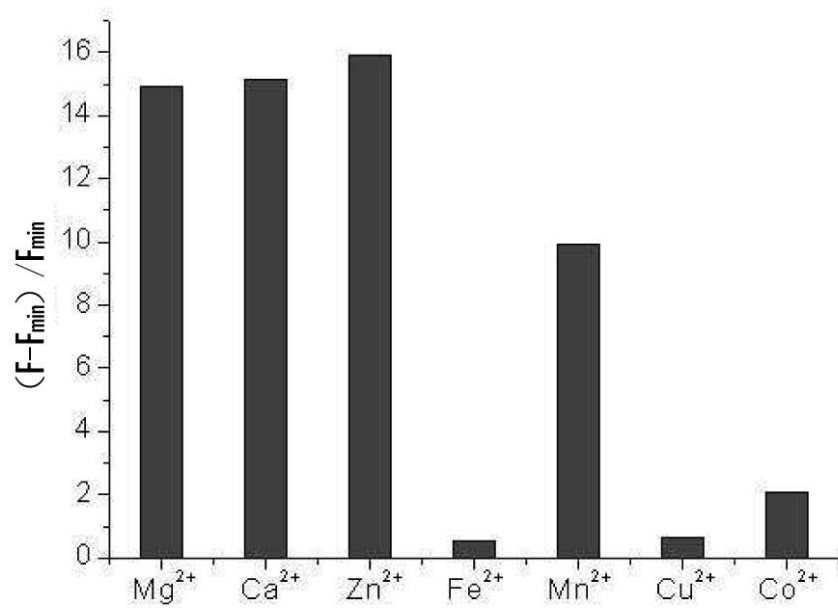
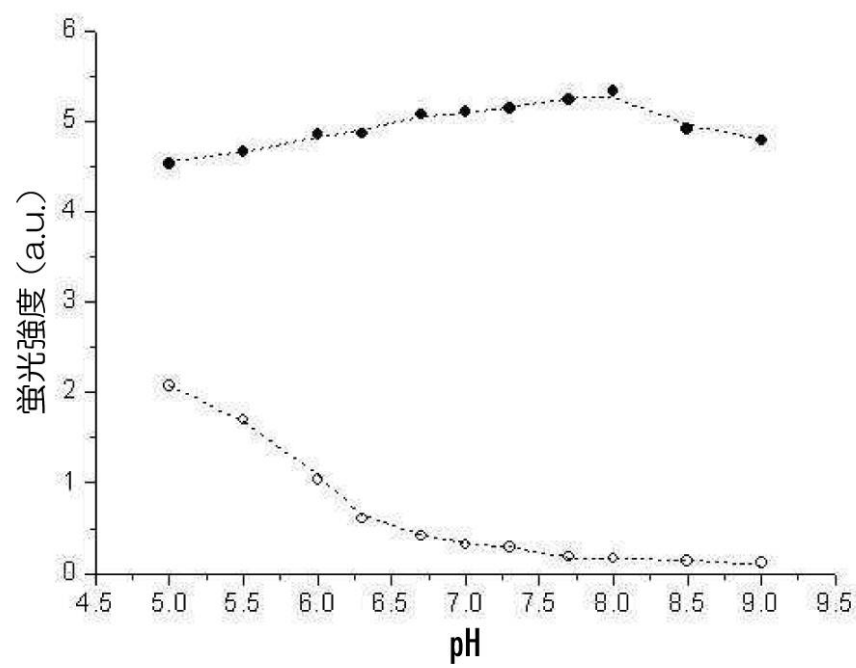
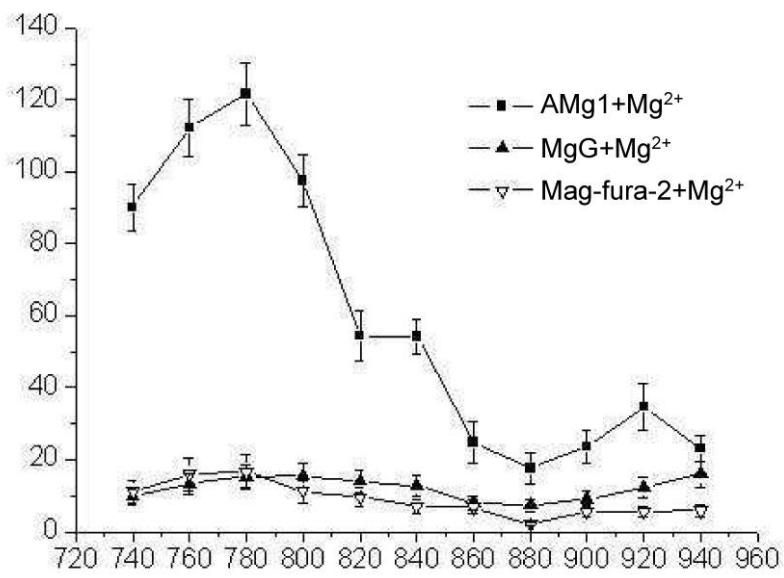


FIG.6 (b)



【図 7】

FIG.7



【図 8】

FIG.8 (a)

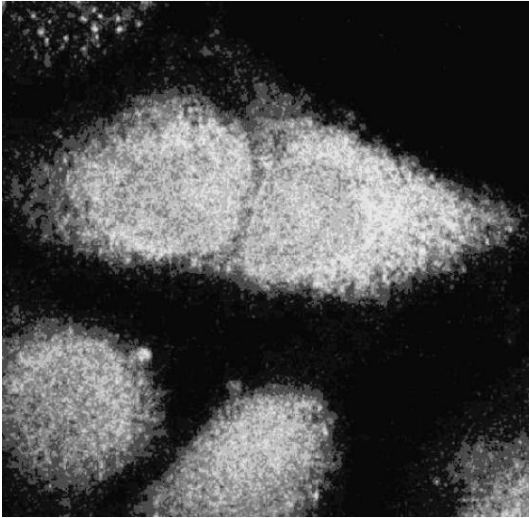


FIG.8 (b)

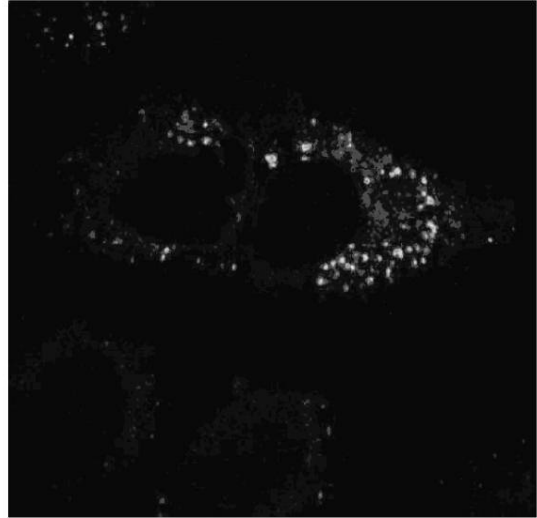


FIG.8 (c)

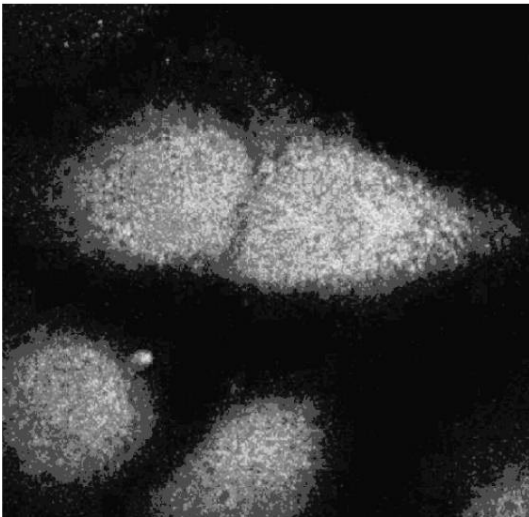
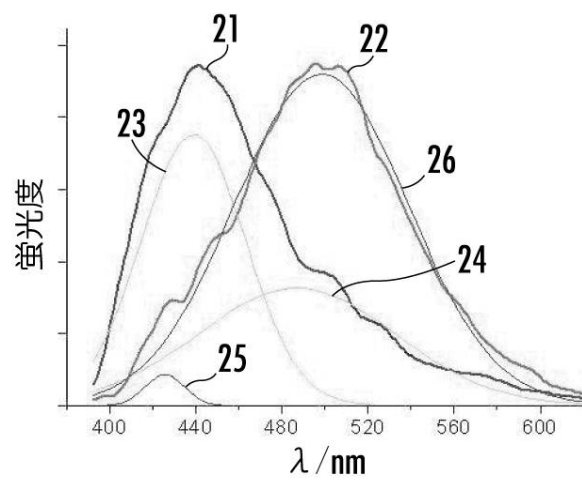


FIG.8 (d)



【図 9】

FIG.9 (a)

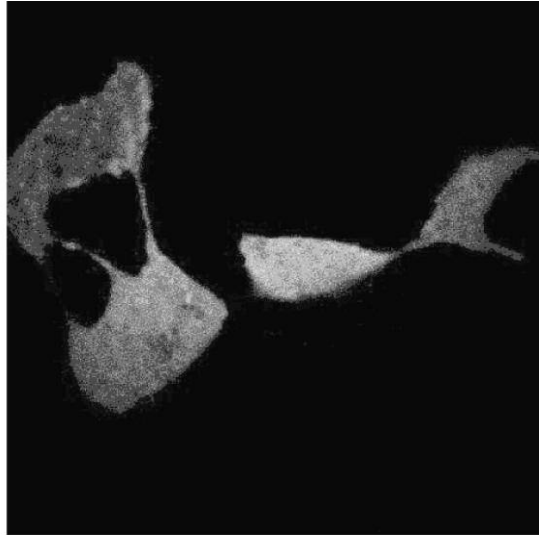
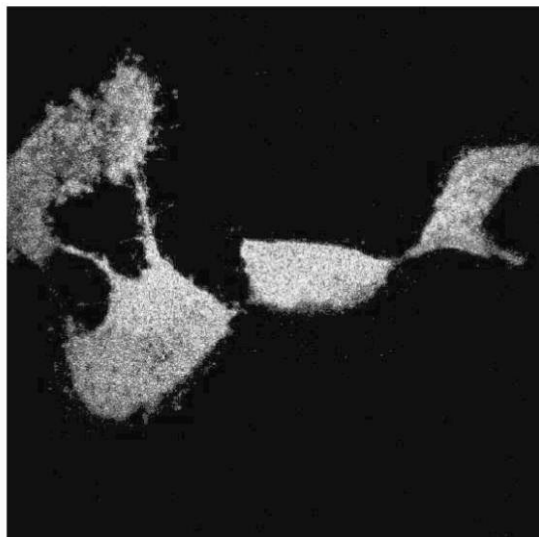


FIG.9 (b)



FIG.9 (c)



【図 10】

FIG.10 (a)

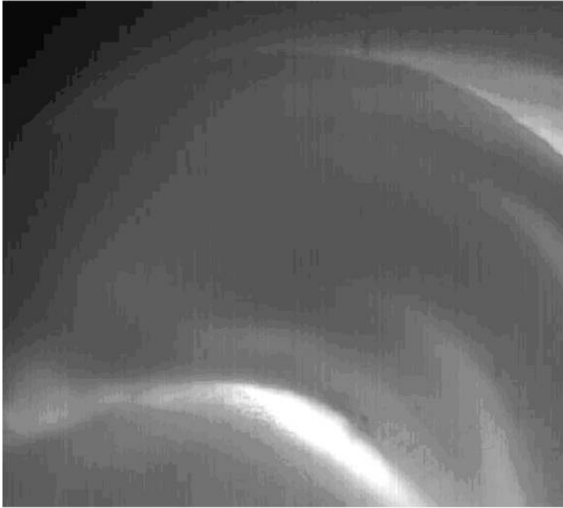


FIG.10 (b)

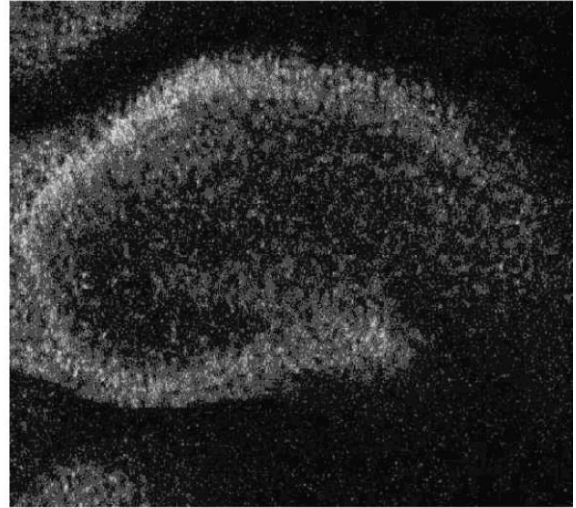


FIG.10 (c)

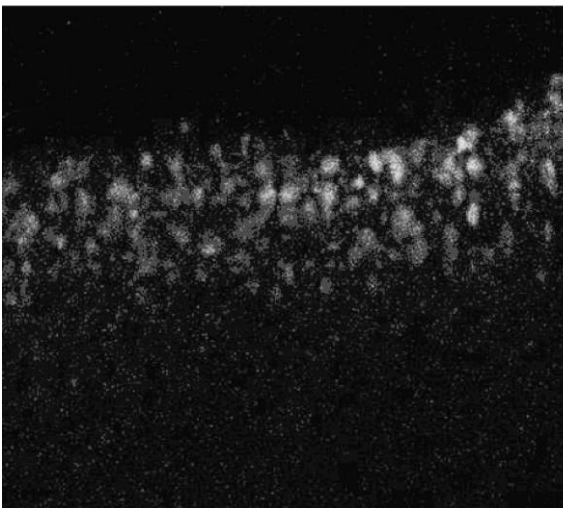
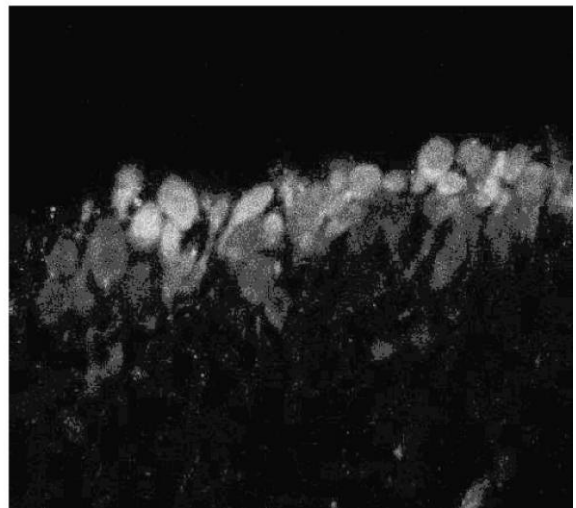


FIG.10 (d)



フロントページの続き

(74)代理人 100125210

弁理士 加賀谷 剛

(72)発明者 趙 奉 來

大韓民国 ソウル特別市 松坡区 松坡洞 漢陽アパート 23棟 207号

審査官 赤坂 祐樹

(56)参考文献 Kim HM et al., Environment-sensitive two-photon probe for intracellular free magnesium ions in live tissue., Angew Chem Int Ed Engl., 2007年 4月 2日, 46(19), 3460-3

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/84

G01N 21/64-21/78

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)