

生細胞プローブのデザイン・合成とその応用

Design Synthesis and Biological Application of Fluorescence Probes

研究代表者 東京大学大学院薬学系研究科 助教授 菊地 和也
Associate Professor, Grad. School of Pharmaceutical Sciences, The Univ. of Tokyo.
Kazuya KIKUCHI

One of the great challenges in the post-genome era is to clarify the biological significance of intracellular molecules directly in living cells. If we can visualize or manipulate a molecule in action, it is possible to acquire biological information, which is unavailable if we deal with cell homogenates. One possible approach is to design and synthesize chemical probes that can convert biological information to chemical reactions that are easily monitored. For this purpose, fluorescence probes for intracellular messengers and chromophore-assisted laser inactivation (CALI) probes have been developed and successfully applied to living cells.

1. 研究目的

現在, ポストゲノムにおける重要な研究課題として, 細胞内に作用する分子の働きを, 生きているその場で解明することが挙げられるようになった. このためには細胞をすりつぶさないうで機能を調べることができれば, 多くの情報が得られると考えられる. この目的達成には有機化学の手法を用いて新規のプローブ分子(以後, 生細胞プローブと呼ぶ)をデザイン・合成することが非常に有効である. 本研究では, 生きた状態における生理作用を直接調べることを目標に, 生理活性物質の機能を探索する生細胞プローブを創り出し, 細胞に応用することに成功してきた(“生きた状態”とはここでは“細胞内で酵素あるいは受容体等が活性やネットワークを保持した状態”をいう).

2. 研究経過

2. 1. Fluorescein 誘導体を用いた蛍光プローブの開発と応用

生体内において, 蛋白質に結合していない

遊離の Zn^{2+} は細胞死や神経伝達に関与していることが報告され, 近年着目されるようになった. しかし, Zn^{2+} の作用機序に関しては不明な点が多く, 生体内での機能は解析されていない. そこで, 細胞内での Zn^{2+} の濃度を測定することが, 機能解析のために有効であると考え, 蛍光プローブの開発を行った.

我々は既に, Fluorescein のベンゼン環部分に一酸化窒素(NO)と特異的に反応するジアミンの構造を組み込み, NO との反応により蛍光量子収率の増大する DAF (Diamonofluorescein)類をデザイン・合成し, 生細胞に応用することに成功していた¹⁾²⁾. この蛍光量子収率の増大は, Photo-induced Electron Transfer (PET)の機構によると考えられ, 芳香族の電子密度の変化により蛍光団である Xanthene の蛍光量子収率が増大する. この PET の機構を応用し, Zn^{2+} のホストを Fluorescein に組み込むことで蛍光プローブを作成した. まず, 環状ポリアミンを Zn^{2+} ホストとして用いた ACF (azacrownfluorone)類を合成した³⁾. ACF 類は, 亜鉛を選択的に検出することが可能であった. しかし, ACF 類

は蛍光強度が Zn^{2+} 添加時、瞬時に増大しないため細胞内の濃度変化を高時間分解能で解析できないという問題点が生じた。この結果は、 Zn^{2+} のホストとして用いている環状ポリアミン骨格の性質によると考え、 Zn^{2+} のホストに *N, N, N', N'*-tetrakis-(2-pyridyl-methyl)-ethylene-diamine (TPEN) 類縁体を用い ZnAF-1 類をデザイン・合成した(Fig.1)。

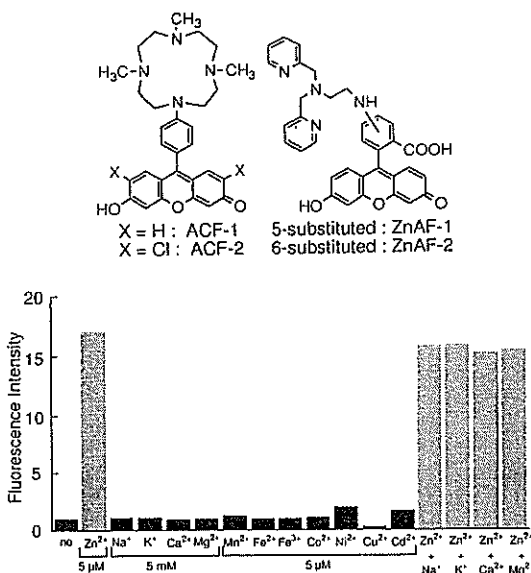


Fig.1 Zn^{2+} 蛍光プローブの構造式及び選択性

このうち、ZnAF-2 は nM オーダーでの濃度変化を測定でき、現存する Zn^{2+} プローブの中で最高感度かつ選択的であり、蛍光強度も瞬時に増大した。さらに、ZnAF-2 を細胞膜透過性に修飾した ZnAF-2 DA (diacetyl) を合成し、マウス由来のマクロファージ RAW264.7 を用い、細胞内の濃度変化を可視化することに成功した⁴⁾。

2. 2. 蛍光共鳴エネルギー移動を用いた蛍光プローブの開発

蛍光プローブを用いて細胞内の生理活性物質を可視化する際、目的とする応答以外の要因(蛍光団の周りの環境や蛍光プローブ自身の局在)によっても蛍光に変化が生じる可能

性がある。2つの波長の蛍光強度変化の比を画像化することを Ratio Imaging というが、この Ratio Imaging を行うことにより、局在等による測定誤差を減ずることができ、生物応用に重要なポイントであることが示されてきた。Ratio Imaging を可能にする原理の1つとして、蛍光共鳴エネルギー移動 (Fluorescence Resonance Energy Transfer: FRET) がある。FRET とはドナー化合物とアクセプター化合物が化学結合により近い位置(通常 50-100Å 以内)にある場合、化合物 A を励起したにもかかわらず化合物 B からの蛍光が観測される現象である。これは励起状態の dipole moment 相互作用に基づく energy transfer 現象で、化学結合が切断され、両化合物が離れた場合には化合物 A 自身の蛍光に変化することになる。すなわちこの原理では、ドナーとアクセプターの間のリンカーを切断することで蛍光波長が変化することになり、比の測定が可能である。しかし、我々は、2つの蛍光団を単純に化学結合した小分子プローブでは、色素同士が疎水的なため水溶液中では会合し消光が起き、FRET が見られない現象を観測していた。そこで、FRET 現象と合成小分子プローブの化学構造との相関を明らかにするため蛍光プローブをデザイン・合成した。

測定対象としては細胞内活性を測定できる蛍光プローブが存在しない Phosphodiesterase(PDE)活性を選択した。蛍光団としてはスペクトルの重なりが大きい Coumarin と Fluorescein を用い、Fig.2 に示すように PDE によって切断される Phosphodiester 構造の両側に蛍光団をつけた CPF 類をデザインした。リンカーには自由度の高い Ethylene 鎖(CPF1)、自由度の少ない Cyclohexane (CPF2)、更にその中間的結合である Ethylene 鎖と Cyclohexane を1つずつ持つ構造(CPF3)を選択した。Coumarin の励起波長である 370 nm で CPF 類を励起したところ、CPF1・3 では FRET による Fluorescein の蛍光がわずかに観測されるものの、蛍光の消光が起きていた。それに対

し、CPF2 では FRET が観測された。この結果よりリンカー部に2つの蛍光団を会合しにくくさせる化学構造を導入することで FRET が観測できることが明らかになった⁵⁾。さらに、FRET が観測でき、かつ酵素で切断可能な CPF4 をデザイン・合成した(Fig.2)⁶⁾。

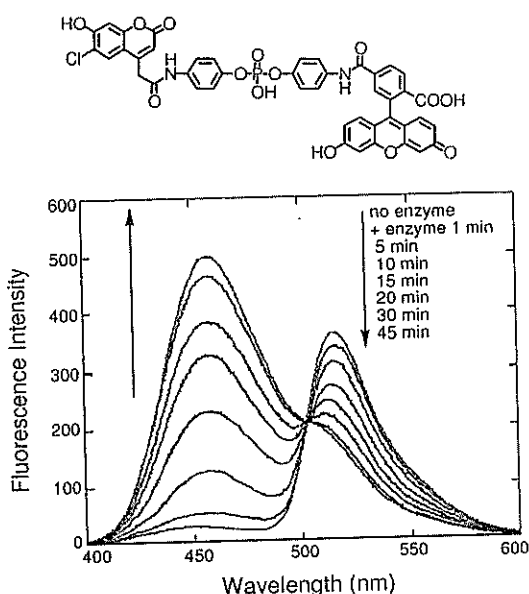


Fig.2 CPF4 の構造式および Phosphodiesterase による切断による蛍光強度変化

2. 3. 小分子を用いたイノシトール3リン酸のレーザー分子不活化

レーザー分子機能不活性化法 (Chromophore-Assisted Laser Inactivation, CALI) は特定の細胞応答過程におけるタンパク機能を *in situ* に解析することのできる非常に有用な手法である。CALI は抗体に色素を結合し、抗体が標的分子と結合した後レーザーを照射することで生じる活性酸素種によって標的分子を失活させる方法として報告された。しかし、従来の CALI では抗体をプローブとするため、不活性化部位を制御できない、細胞への導入が困難な事等問題点があった。そこで、これらの問題を解決するため、抗体の代わりに合成小分子プローブを用いることを考えた。

今回、イノシトール三リン酸 (IP₃) 受容体を標的分子として選択し、IP₃ の1位のリン酸にクロモフォアであるマラカイトグリーンを結合させた CALI 用プローブ(MGIP₃)を合成した。MGIP₃ は K_d 値がサブ nM と現存する IP₃ リガンドで最強かつ特異的な親和性を持つこと、また弱いアゴニスト活性を有することを示した。続いて、モルモットの平滑筋組織に MGIP₃ を添加しレーザーを照射すると、IP₃ 受容体からの Ca²⁺放出が抑制された。また、MGIP₃ の光学異性体を添加してレーザーを照射しても抑制はみられなかった。以上の結果から、合成小分子プローブ MGIP₃ を用いた CALI により、IP₃ 受容体を特異的に不活性化できることが示され、細胞内情報伝達系における Ca²⁺の時間と場所による役割の違いを解明していくことができると考えられる⁷⁾。

3. 研究成果

生物実験系に応用することが可能な生細胞プローブをデザイン・合成することに成功した。この成功により Zn²⁺、加水分解酵素の可視化解析、及び IP₃ 受容体の時空間を制御したリアルタイム機能不活化が可能となった。

4. 今後の課題と発展

今後の課題として、さらに他種類の生体内活性物質の作用を可視化する生細胞プローブを作製することが挙げられる。具体的には、現在リン酸化及び脱リン酸化酵素用蛍光プローブあるいは核磁気共鳴を用いた個体全体での Zn²⁺濃度の可視化プローブの作製に取り組んでいる。

また、今後の発展性としては、本研究で作製したプローブを用いた生理機能解析が挙げられる。実際に Zn²⁺プローブによって神経細胞内における Zn²⁺の変化と化学刺激との相関が示されつつあり、生体内における Zn²⁺の機能がさらに示されると予想される。

5. 発表論文リスト

- 1) Kojima H., Hirotsu M., Urano Y., Kikuchi K., Higuchi T. & Nagano T.: Fluorescent Indicators for Nitric Oxide Based on Rhodamine

- Chromophore. *Tetrahedron Lett.*, **41** : 69-72, 2000.
- 2) Kojima H., Hirata M., Kudo Y., Kikuchi K. & Nagano T. : Visualization of Oxygen Concentration-dependent Production of Nitric Oxide in Rat Hippocampal Slices During Aglycemia. *J. Neurochem.* **76** : 1404-1410, 2000.
 - 3) Hirano T., Kikuchi K., Urano Y., Higuchi T. & Nagano T. : Novel Zinc Fluorescent Probes Excitable with Visible Light for Biological Applications. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **39** : 1052-1054, 2000.
 - 4) Hirano T., Kikuchi K., Urano Y., Higuchi T. & Nagano T. : Highly Zinc-Selective Fluorescent Sensor Molecules Suitable for Biological Applications. *J. Am. Chem. Soc.*, **122** : 12399-12400, 2000.
 - 5) Kawanishi Y., Kikuchi K., Takakusa H., Mizukami S., Urano Y., Higuchi T. & Nagano T. : Design and Synthesis of Intramolecular Resonance Energy Transfer Probes for Use in Ratiometric Measurements in Aqueous Solution. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **39** : 3438-3440, 2000.
 - 6) Takakusa H., Kikuchi K., Urano Y., Higuchi T. & Nagano T. : Intramolecular Fluorescence Resonance Energy Transfer System with Coumarin Donor Included in beta-Cyclodextrin. *Anal. Chem.* **73** : 939-942, 2001.
 - 7) Inoue T., Kikuchi K., Hirose K., Iino M. & Nagano T. : Small Molecule-based Laser Inactivation of Inositol 1,4,5-Triphosphate Receptor. *Chemistry & Biology*, **8** : 9-15, 2001.