

## 研究課題別評価

1 研究課題名:新規蛍光プローブの創製による機能分子の細胞内可視化

2 研究者氏名:菊地 和也

研究員:橋本茂樹(研究期間:H14.6.1~H17.3.31)

平山裕樹(研究期間:H14.4.1~H16.11.30)

3 研究の狙い:

生細胞において生体内分子は、その生理機能が発揮される特殊な生体組織や個体発生上の特殊な時間に発現している。本研究では、生体内で機能する分子をリアルタイムに可視化あるいは不活化することで生きた状態における機能解明を行う。この結果、タイムシグナルについて詳細な解析が可能になる。

上記の目的のため、新たな実験系として生細胞蛍光プローブと名付けた化学プローブをデザイン・合成し、生細胞あるいは生きた個体に直接応用する。具体的には、機能分子可視化プローブをデザイン・合成し、生物系へ応用する。

この様に生体内分子が時間的・空間的にどのように振る舞って機能するか調べることはポストゲノム時代の重要な研究課題であると考えられる。

4 研究成果:

(1)亜鉛イオン( $Zn^{2+}$ )応答性蛍光プローブ

遊離の  $Zn^{2+}$ は神経伝達に関与していることが報告され、近年着目されている。そこで、 $Zn^{2+}$ を可視化するための蛍光プローブの開発を行った。このうち、ZnAF-2 は最高感度かつ選択的であり、ラット脳海馬スライスを用いた実験で生きた状態での  $Zn^{2+}$ 濃度変化を初めて可視化することに成功した。まず正常時、 $Zn^{2+}$ はCA3及び歯状回においてvesicle内に高濃度で存在することを示した。さらに、 $Zn^{2+}$ の存在が示されたCA3領域の苔状線維に電気刺激を与え、 $Zn^{2+}$ 放出を可視化した。この結果、神経伝達物質放出に遅れて放出された  $Zn^{2+}$ は近位の放線層へとゆっくりと拡散することが可視化された。さらに、放出された  $Zn^{2+}$ の機能を調べるため、苔状線維刺激と同時にNMDA受容体及びAMPA受容体の機能を調べ、 $Zn^{2+}$ がNMDA作動性のグルタミン酸神経系を抑制することが初めて示された。

次に、 $Zn^{2+}$ 放出の濃度を調べるプローブを作製した。ZnAF-2の $Zn^{2+}$ に対するみかけの解離定数( $K_d$ )はnMオーダーであり、0.1nM~10nMの $Zn^{2+}$ を検出することができる。しかし、これまでの実験では脳内においてはるかに高い $Zn^{2+}$ 濃度変化が生じることが示唆された。そこで、 $Zn^{2+}$ に対する選択性を維持したまま親和性を变化させた蛍光プローブを5種類デザイン・合成した。いずれのプローブもZnAF-2より高濃度の領域で蛍光強度が変化し、この5種類のプローブを用いれば、 $10^{-10}$ ~ $10^{-3}$ Mと広い範囲にわたる $Zn^{2+}$ の濃度変化を捉えられる。これらのプローブを用いて脳内の $Zn^{2+}$ 放出がnMから $\mu$ Mオーダーまで部位によって変化することを示した。

最後に、高精度の測定を行うために長寿命蛍光を発するランタノイド金属錯体を用いた $Zn^{2+}$ 蛍光プローブを作製した。生体試料中には蛍光成分が含まれており、通常の測定ではバックグラウンド蛍光が大きい。時間分解蛍光測定を行いノイズレベルを減じることができる。そこで、ミリ秒オーダーの長寿命蛍光を持つ $Eu^{3+}$ 錯体を用いた $Zn^{2+}$ 蛍光プローブをデザイン・合成した。この蛍光プローブはキノリン環を $Zn^{2+}$ キレーターかつ $Eu^{3+}$ へのエネルギー供与を行うアンテナとして有しており、 $Zn^{2+}$ 配位により蛍光スイッチとなることを期待した。このプローブは $Zn^{2+}$ の添加により大きな蛍光上昇を示し、時間分解蛍光イメージングを組み合わせることでノイズである短寿命蛍光を取り除くことができた。

## (2) FRET 型チロシンフォスファターゼ(PTP)測定用蛍光プローブ

異なる2波長での蛍光強度を測定しその比(レシオ)を検出するレシオ測定法は、蛍光プローブ自身の局在や濃度変化、試料の大きさや厚さの違い、励起光強度のばらつきなどの影響を減じることができるため、バイオイメージングを行う際に特に有利な測定法である。FRET 型蛍光プローブはこのレシオ測定を可能とする。FRET 効率を決定する因子のうち分子デザインによって変化させうる因子は3つ(配向定数:  $\kappa^2$ , 重なり積分:  $J$ , ドナーとアクセプターの距離:  $r$ )ある。このうち、2つの因子(距離:  $r$ , 重なり積分:  $J$ )に着目し、研究を開始した。

まず、距離変化型プローブを開発し、細胞質環境で機能するプローブを作製するためには、消光の原因となる色素の会合が起こらない分子設計が必要であることを示した。次に、重なり積分( $J$ )を変化させるプローブデザインを行った。Fluorescein が吸収特性の大きく異なる2つのコンフォメーション(lactone 型と quinoid 型)をとることに着目して、重なり積分変化をスイッチとする設計法を新規に考案した。この原理に基づき、PTP レシオプローブを設計・合成した。次に、このプローブを用いたイメージングで正常細胞の接触阻止と PTP 活性の関連について解析することを試みた。接触阻止を起こすマウス筋芽細胞 C2C12 を用いて細胞密度と PTP 活性との関係を調べたところ、接触阻止が起こる際に PTP 活性が増大することを示した。また、阻害剤を用いた検討の結果、アラキドン酸代謝経路より産生される ROS が PTP 活性の調節因子となっていることが示唆された。

## (3) 蛍光性ランタノイド錯体の蛍光強度制御

希土類金属のうち  $Tb^{3+}$ ,  $Eu^{3+}$  は適切な発色団(antenna)を持つ ligand と錯形成し、特徴的なミリ秒オーダーの長寿命蛍光を発する。通常の有機化合物の蛍光寿命はナノ秒オーダーであるため、この蛍光が減衰した後、蛍光測定を開始することで希土類金属蛍光錯体からの蛍光を選択的に得ることができる。この希土類金属蛍光錯体は主に蛍光標識化試薬として用いられていた。本研究においては、特定のシグナルにตอบสนองして蛍光 off/on 制御を可能とすることを目的とした。

蛍光制御手段として光誘起電子移動(Photoinduced Electron Transfer, PET)を用いた。PET とは一電子励起された蛍光団の近傍に電子供与性を有する官能基が存在するときに起きる官能基から蛍光団への電子移動である。電子供与性の違う off/on switch を持つ錯体を新規にデザイン・合成し、水溶液中で蛍光測定を行ったところ蛍光量子収率は off/on switch の HOMO level とよい相関を示した。蛍光 off/on の threshold が - 5.8 eV 付近と見積もられ、off/on switch の HOMO level がこの threshold より低い錯体は蛍光性であり、高い錯体は無蛍光性であった。さらに、off/on switch に aniline を用いた錯体の蛍光は pH 依存性を持ち、中性条件下では無蛍光性であるが、酸性条件下では強い蛍光を有する。

本研究において、希土類金属蛍光錯体の蛍光が PET により制御が可能であることを示し、機能性希土類金属蛍光錯体の開発における設計指針を示した。この研究内容については特許取得申請も行った。

## 5 自己評価:

研究代表者は、実際に生物学研究に応用して新しい現象を見つけ出すプローブ分子を作製することを謳ってこの領域に採用して頂いた。この生物応用の成功の度合いから考えると、項目4に記したプローブ類については目標が達成されたと考えている。しかし、蛋白質リン酸化や *in vivo* イメージングプローブについては、試験管レベルでの測定には成功したが、実際の生物応用には成功していない。また、この結果から、これまでのプローブが個々の測定対象に向けられていたのに対し、汎用性のある技術を創り出すことの重要性が明らかになった。これらの今後の課題が残された点が残念ではあるが、実際の生物学の研究者との交流を持つことで、問題点が明確になった点で研究開始時より着実に進歩したとは考えている。

研究開始時に蛍光顕微鏡システムを調達することができ、また有機合成のためのインフラ整備も整い、研究しやすい環境が整った。さらに、これ以上に私にとって意義深かった面が2つ挙げられ

る。一つは、生物学の研究者との人的交流である。同世代の生物学の研究者と話し合うことができ、今後の研究方向性を考える上で非常に役に立った。もう一つの意義としてはこの人的交流の結果、研究内容のみならず研究哲学についても考え直すことができ、研究に対する意識が深まったことである。今後も分野融合に基づく研究を行っていきたいと考えているが、この研究方向を進む上で、自分の独自性についてさらに改善が必要な点と自信を持つべき点が明確となった。これらの点からこの3年で得られた成果は研究人生において大変有意義であり、今後の展開につながると考えている。

全体としての反省点としては、上記の成果の上でもまだ生物学についての深さが身に付いていない点が挙げられる。これについては、今後の課題として残っている。しかし、研究代表者の独自性は化学のバックグラウンドから生まれるものである。この化学研究について深めながらも、生物学に積極的に取り組んでいきたい。

#### 6 研究総括の見解:

極めて順調に推移しており、将来への更なる展開を期待できる成果をあげ、この分野のリーダーシップをとりつつあることは評価出来る。本人も自己評価で述べているように、生物学者、更には医学分野の研究者など異分野の研究者との交流、連携、共同に一層心がけて欲しい。それにより、単なる課題解決型研究に止まることなく、課題発見型研究へと展開する転機をつかんで欲しい。発表のほとんどは一流の紙上で為されているが、トップあるいはラスト順位のものがない点は注意のこと。所属する研究室のポリシーによるのかもしれないが、将来への発展を考えると一考を要する。

#### 7 主な論文等:

##### 論文

1. Kawabata, K. Kikuchi, Y. Urano, H. Kojima, A. Odani & T. Nagano, Design and Synthesis of Zinc-Selective Chelators for Extracellular Applications. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, ASAP article (2005)
2. K. Hanaoka, K. Kikuchi, H. Kojima, Y. Urano & T. Nagano, Development of a Zinc Ion-selective Luminescent Lanthanide Chemosensor for Biological Applications. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 12470-12476 (2004)
3. T. Yogo, K. Kikuchi, K. Hirose, M. Iino & T. Nagano, Modification of Intracellular  $Ca^{2+}$  Dynamics by Laser Inactivation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Using Membrane-permeant Probes. *Chemistry & Biology*, **11**, 1053-1058 (2004)
4. K. Hanaoka, K. Kikuchi, H. Kojima, Y. Urano & T. Nagano, Selective Detection of Zinc Ions with Novel Luminescent Lanthanide Probes. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **42**, 2996-2999 (2003)
5. T. Inoue, K. Kikuchi, K. Hirose, M. Iino & T. Nagano, Spatiotemporal Laser Inactivation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors Using Synthetic Small-molecule Probes. *Chemistry & Biology*, **10**, 503-509 (2003)
6. H. Takakusa, K. Kikuchi, Y. Urano, H. Kojima & T. Nagano, A Novel Design Method of Ratiometric Fluorescent Probes Based on Fluorescence Resonance Energy Transfer Switching by Spectral Overlap Integral. *Chem. Eur. J.*, **9**, 1479-1485 (2003)
7. S. Mizukami, T. Nagano, Y. Urano, A. Odani & K. Kikuchi,

- A Fluorescent Anion Sensor That Works in Neutral Aqueous Solution for Bioanalytical Application.  
*J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 3920-3925 (2002)
8. T. Hirano, K. Kikuchi, Y. Urano & T. Nagano,  
Improved Fluorescent Probes for Zinc, ZnAFs, Suitable for Biological Applications.  
*J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 6555-6562 (2002)
9. H. Takakusa, K. Kikuchi, Y. Urano, S. Sakamoto, K. Yamaguchi & T. Nagano,  
Design and Synthesis of an Enzyme-Cleavable Sensor Molecule for Phosphodiesterase  
Activity Based on Fluorescence Resonance Energy Transfer.  
*J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 1653-1657 (2002)
10. S. Maruyama, K. Kikuchi, T. Hirano, Y. Urano & T. Nagano,  
A Novel, Cell-Permeable, Fluorescent Probe for Ratiometric Imaging of Zinc Ion.  
*J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 10650-10651 (2002)

#### 総説

1. K. Kikuchi, K. Komatsu & T. Nagano,  
Zinc Sensing for Cellular Applications.  
*Curr. Opin. Chem. Biol.*, **8**, 182-191 (2004)
2. K. Kikuchi, H. Takakusa & T. Nagano,  
Recent Advances in Design of Small Molecule Based FRET Sensors for Cell Biology.  
*Trends Anal. Chem.*, **23**, 407-415 (2004)

#### 口頭発表

##### 国際会議

招待講演 7件(海外 4件, 国内 3件)

##### 国内学会・研究会等

招待講演 33件

(受賞講演 2件, 特別講演 1件, 教育講演 2件, シンポジウム 23件, 研究会 5件)

#### 受賞

平成 14 年 日本薬学会奨励賞受賞

平成 14 年 とやま賞受賞

平成 16 年 日本バイオイメージング学会奨励賞受賞

#### 特許出願

1. 菊地和也, 岩澤伸哉, 長野哲雄(2003)「蛍光性ランタニド錯体」  
特願 2003-045786 国際出願番号:PCT/JP2004/001680
2. 菊地 和也, 水上進, 長野 哲雄(2002)「アニオン検出用蛍光センサー」  
特願 2002-61098 特開 2003-254909