

研究報告書

「多機能蛍光プローブ群による組織内1細胞機能解析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 26 年 10 月～平成 30 年 6 月

研究者: 神谷 真子

1. 研究のねらい

生命機能や病因の解明を行う上で、組織や病巣を形成する個々の細胞の挙動や性質を把握することは急務の課題である。本研究は、蛍光イメージングで評価し得る“酵素活性・酸化還元状態”などの生きた細胞が有する質的特徴を、様々な細胞が複雑に入り混じる組織中の1細胞レベルで引き出し、個々の細胞の性質や個性を理解することを目的とした。我々は以前までに、分子内スピロ環化平衡や光誘起電子移動を蛍光制御原理とした、様々な光機能性小分子を開発してきたが、これらの組織への適用を考えた場合、より高次元の分子設計が求められていた。例えば、組織中の1細胞レベルで特定の酵素活性を検出したい場合、既存の小分子蛍光プローブでは、酵素との反応生成物である蛍光色素が拡散してしまい、組織中の1細胞レベルの空間分解能で、酵素を発現する細胞の特定やその機能を解析することは困難であった。また、時々刻々と変化する細胞内の酸化還元状態を観測したい場合には、細胞内の酸化還元物質を可逆的かつ定量的に検出する分子の開発が必須であった。

そこで本研究においては、“組織中における酵素活性を1細胞レベルで検出可能な蛍光プローブ(研究テーマA)”と、“細胞内の酸化還元物質に対し可逆的な蛍光応答を示す検出プローブ(研究テーマB)”を創製することを目標とした。研究テーマAでは、通常は蛍光性・細胞内滞留性がなく組織を透過するが、特定の細胞で高発現している酵素により活性化されると、蛍光性および細胞内滞留性を同時に獲得し細胞内にトラップされる蛍光プローブを、研究テーマBでは、細胞内の主たる還元物質であるグルタチオン(GSH)に対して応答可逆性と定量性を示す蛍光プローブを、独自の分子設計法を活用して開発することを目標とした。さらに、開発した蛍光プローブを培養細胞や組織に適用し、1細胞レベルで標的分子の可視化が可能か、組織中の相対位置を保持した状態での標的細胞の可視化・機能解析を行うことも、併せて本研究の目標とした。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、酵素活性や酸化還元状態などの生きた細胞が有する質的特徴を、1細胞レベルで抽出するための新規蛍光プローブの開発を行った。研究テーマAでは、分子内スピロ環化平衡による蛍光制御とキノンメチド化学を組み合わせることで、通常は蛍光性・細胞内滞留性がなく組織を透過するが、特定の細胞で高発現している標的酵素と反応して初めて蛍光性と細胞内滞留性を同時に獲得する小分子プローブの設計法を開発した。本設計法に則り開発した、 β -galactosidase 活性検出蛍光プローブ SPiDER- β Gal は、固定組織のみならず、未固定の組織中における β -galactosidase 活性も1細胞レベルで検出可能であるという、従来のプローブにはない優れた特長を有することが明らかとなった。従って、未固定の脳スライス

中の lacZ 発現細胞を蛍光検出し、その蛍光シグナルを指標に電極を刺して電気生理実験を行うといった実験も可能であることが示された。研究テーマBでは、細胞内の主たる還元物質であるグルタチオン(GSH)の持つ高い求核性に着目し、キサントレン色素の9位炭素への求核付加反応とそれに伴う可視光領域の吸収・蛍光特性の消失を蛍光制御原理として用いた。まず、9位炭素の求電子性や立体的な accessibility が異なる複数種のローダミン、ピロニン誘導体を合成し、生理的 GSH 濃度範囲において吸収/蛍光強度が GSH 濃度依存的かつ可逆的に変化する誘導体を探索した。その結果、シリルローダミン誘導体 2Me' SiR610 が、適切な平衡定数を示すとともに、高い蛍光量子収率および反応速度定数を示すことが明らかとなった。さらに、GSH との反応性を示さないローダミン誘導体(TMR)との FRET ペアとすることで、GSH 濃度の変化に伴い蛍光波長がシフトする波長変化型蛍光プローブ QG3.0 を開発した。さらに、QG3.0 を培養細胞に適用したところ、細胞種により定常状態の GSH 濃度が大きく異なることが示され、さらに、各種酸化ストレス刺激による生細胞内 GSH 濃度変動をリアルタイムかつ定量的に追跡できることを実証した。

(2) 詳細

研究テーマA「組織中における酵素活性を1細胞レベルで検出可能な蛍光プローブの開発」

酵素は、あらゆる生理機能・過程における生体内化学反応を触媒しているが、その活性は組織・時間・環境等により大きく異なるため、細胞集団での解析ではなく、1細胞毎の酵素活性の多寡や局在を解析することで、各々の細胞の個性や機能の理解につながると考えられる。しかしながら、既存の小分子型酵素活性検出蛍光プローブは、酵素反応生成物である蛍光色素が拡散するため、組織中の1細胞レベルの空間分解能で、標的酵素を発現する細胞の特定や機能解析を行うことは困難であった。

そこで本研究では、分子内スピロ環化平衡による蛍光制御とキノンメチド化学を組み合わせることで、通常は蛍光性・細胞内滞留性がなく組織を透過するが、特定の細胞で高発現している標的酵素と反応して初めて蛍光性と細胞内滞留性を同時に獲得する小分子プローブを開発することを考えた。具体的な標的酵素としては、レポーター酵素として汎用されている β -galactosidase を、キノンメチド活性中間体を産生するための脱離基としては、化学的安定性に優れかつ脱離能が高いフッ素を選択し、我々が以前開発した細胞膜透過性 β -galactosidase 蛍光プローブ HMDER- β Gal (*J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 12960-12963) の4位にフルオロメチル基を導入して新規 β -galactosidase 活性検出蛍光プローブ SPiDER- β Gal を設計した(図 1a)。SPiDER- β Gal は中性緩衝液中においてスピロ環化構造の閉環体として存在すると予想されたため、酵素との反応前は無色・無蛍光性であるが、細胞内で β -galactosidase による加水分解を受けると、フッ素原子が脱離して求電子性のキノンメチド体が生成し、これがタンパク質などの細胞内求核分子と反応して蛍光性を獲得すると考えた。つまり、細胞内タンパク質にラベル化された蛍光色素は細胞外へ漏出しないため、蛍光色素の拡散を防ぐことができるのではないかと考えた。

次に、開発した SPiDER- β Gal を基質とした *in vitro* 酵素反応を行った結果、SPiDER- β Gal は β -galactosidase との反応により、大きな吸収スペクトル・蛍光スペクトルの回復を示すことが明らかとなった(図 1b)。さらに、酵素との反応により、キノンメチド中間体が産生し、それが

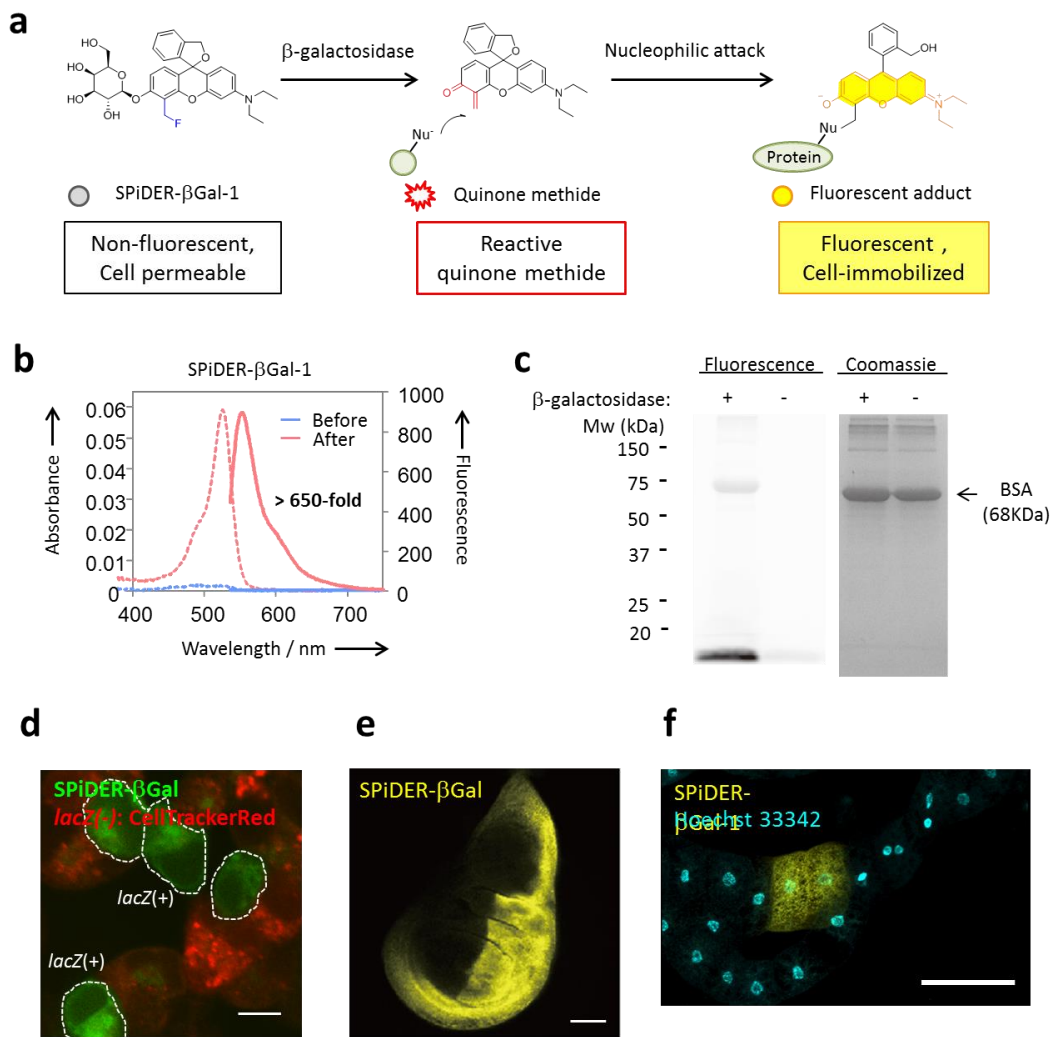


図 1. a) SPiDER-βGal の構造式と動作原理。酵素との反応によりキノンメチド活性中間体が産生し、それがタンパク質等の細胞内分子に捕捉されて細胞内に蓄積するよう分子設計した。b) SPiDER-βGal の β-ガラクトシダーゼとの反応前後の吸収・蛍光スペクトル、c) β-ガラクトシダーゼとの反応前後の SPiDER-βGal 溶液の SDS-PAGE (BSA 存在下)、d) HEK-lacZ(+)細胞と HEK-lacZ(-)細胞の共培養系における lacZ 発現細胞のライブ蛍光検出。緑色：SPiDER-βGal、赤色：Cell Tracker Red。スケールバー：10 μm。e) ショウジョウバエの en-lacZ wing disc における lacZ 発現領域の蛍光検出、f) ショウジョウバエの flip-out clone 脂肪体組織中における lacZ 発現細胞の蛍光検出。スケールバー：100 μm。

周辺の蛋白質などの求核分子と反応することを SDS-PAGE により確認した(図 1c)。さらに、HEK-lacZ(+)細胞と HEK-lacZ(-)細胞 (Cell Tracker Red CMTPX で前処理)を共培養した系に SPiDER-βGal を適用した結果、lacZ 発現細胞と lacZ 非発現細胞が混在している中から lacZ 発現細胞のみを選択的に可視化できることが示された(図 1d)。

さらに、遺伝学におけるモデル動物として汎用されているショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) 組織における lacZ 発現細胞のライブ検出が可能か検討した。まず、posterior

region のみに lacZ を発現している wing disc (翅原基) をショウジョウバエ幼虫から取り出し、SPiDER-βGal とインキュベーションしたところ、lacZ を発現している領域のみで蛍光シグナルの上昇が観察され、明瞭な境界線をもって、lacZ 発現領域と非発現領域を区別可能であることが明らかとなった (図 1e)。次に、確率的なパターンで lacZ を発現するショウジョウバエ脂肪体組織に SPiDER-βGal と核染色剤 Hoechst 33342 を同時適用したところ、lacZ 発現細胞を 1 細胞レベルで描出できることが明らかとなった (図 1f)。さらに、固定組織において抗体染色との併用が可能であることも示した。次に、lacZ 発現マウスから調製した未固定の脳スライスを用いた検討を行ったところ、SPiDER-βGal の適用により lacZ 発現細胞を感度よく蛍光染色できることが明らかとなり、さらに、この蛍光シグナルを指標として電極を刺して電気生理実験を行うことも可能であることが示された。

以上の結果から、SPiDER-βGal は生体組織中の lacZ 発現細胞の選択的な蛍光検出に有用であることが実証された。つまり、分子内スピロ環化平衡による蛍光制御とキノンメチド活性中間体の生成が同時に起こるよう分子設計することで、組織中の 1 細胞レベルの空間分解能で、標的酵素活性を検出する蛍光プローブの創製が可能であることが示された。

本成果は、原著論文として Angew. Chem. Int. Ed. に採択された (研究成果リスト・論文 1)。また、SPiDER-βGal は既に市販化され、国内外の幅広い研究者が使用し高い評価を得ている。

研究テーマB「細胞内の酸化還元物質に対し可逆的な蛍光応答を示す検出プローブの開発」

グルタチオン (GSH) は、細胞内において酸化ストレスに対する主たる還元剤として存在するため、その酸化還元状態 (GSH/GSSG) は細胞内のレドックスステートを反映する一つのパラメータであるが、既存の GSH 検出蛍光プローブの殆どが、GSH の求核性を利用した“不可逆反応”に基づく設計であるため、時々刻々と変化する GSH/GSSG バランスを追跡することは不可能であった。そこで本研究においては、GSH に対する“応答可逆性”を付与することで、生きた細胞内における GSH の濃度変動をリアルタイムに検出することを目的とした。

具体的には、キサンテン環 9 位炭素への GSH 求核付加反応とそれに伴う可視光領域の吸収・蛍光特性の消失に着目し、本現象を可逆的スイッチング機構として利用することを考えた (図 2a)。そこで、9 位炭素の求電子性や立体的な accessibility が異なる複数種のローダミン、ピロニン誘導体を開発し、生理的 GSH 濃度の範囲内において吸収/蛍光強度が GSH 濃度依存かつ可逆的に変化する誘導体を探索した。その結果、キサンテン環 10 位元素としてケイ素を持つシリルローダミン誘導体が、生理的濃度の GSH 存在下において GSH と分子間平衡反応を示すとともに、GSH 添加後 1 秒程度で平衡に達し、十分に速い反応速度定数を示すことが明らかとなった。さらに、蛍光量子収率や平衡定数といった観点から、シリルローダミン誘導体の構造展開、最適化を行った結果、細胞内グルタチオン濃度を検出するのに最も適した蛍光色素 2Me' SiR610 の開発に成功した。さらに、GSH に対し反応性を示さないローダミン誘導体 (TMR) との FRET (フェルスター共鳴エネルギー移動) ペアとすることで、GSH 濃度の変化に伴い蛍光波長がシフトする波長変化型蛍光プローブ QG3.0 の開発に成功した (図 2b)。QG3.0 は、低 GSH 濃度下においては、TMR から 2Me' SiR610 への FRET が起こるため 630 nm を最大蛍光波長とする蛍光スペクトルを示すが、高 GSH 濃度下においては、SiR610 に GSH が求核付加することでキサンテン部位の共役系が切断されるため、FRET が起こらず 590 nm を最大蛍光波長とした蛍光スペクトルを示す。そのため、630 nm と 590 nm における蛍光

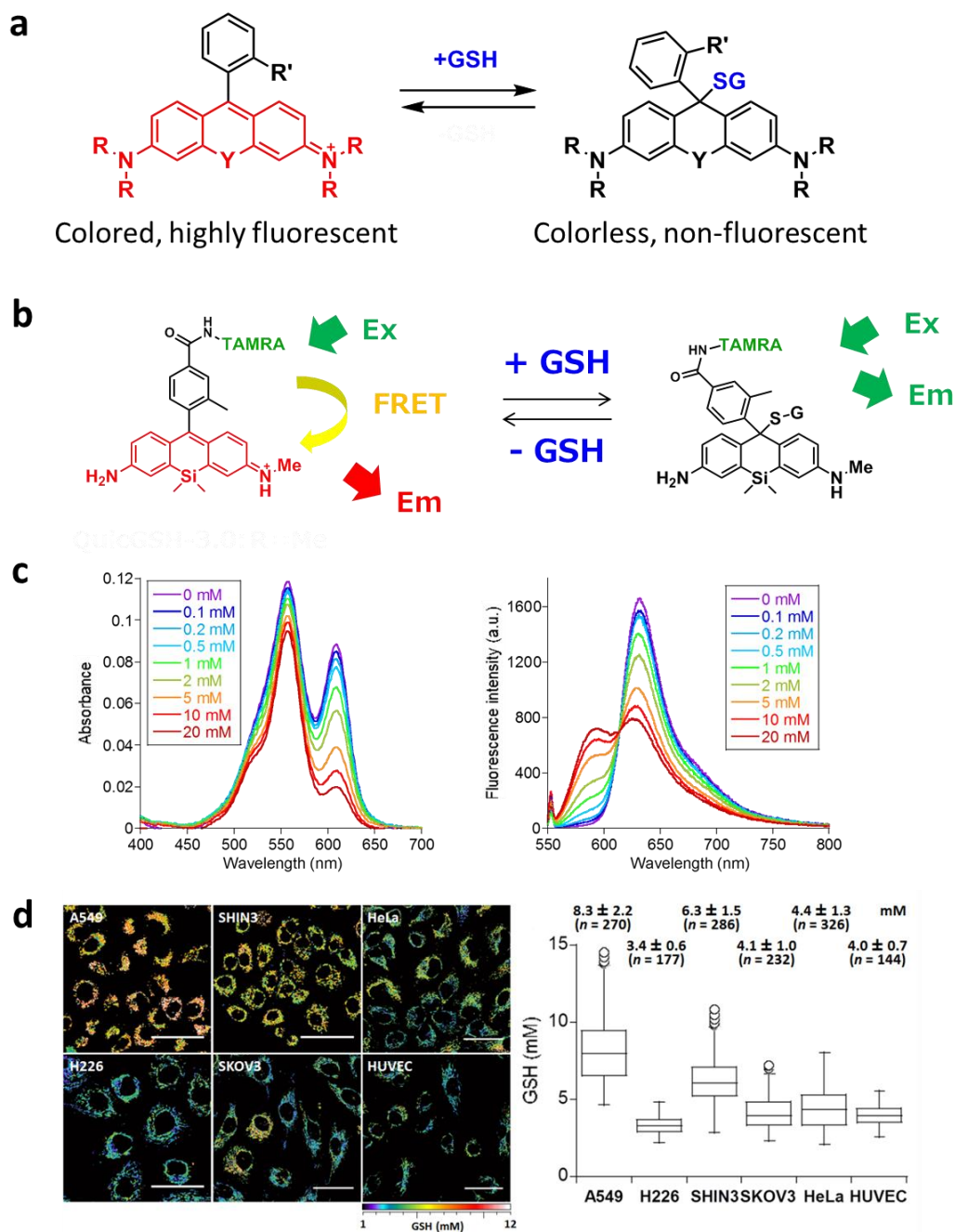


図 2. a) キサンテン環 9 位炭素への GSH 求核付加反応とそれに伴う可視光領域の吸収・蛍光特性の消失現象、b) QG3.0 の構造式と動作原理、c) QG3.0 の GSH 添加に伴う吸収・蛍光スペクトル変化、d) 各種培養細胞における GSH 濃度定量。スケールバー：50 μm 。

強度の比率を用いることで、定量的かつ可逆的な GSH 濃度解析が可能になった(図 2c)。

次に、QG3.0 を培養細胞に適用し、生細胞内の GSH 濃度の定量が可能か検討した。具体的には、励起光として 550 nm (TMR の励起波長) を用い、560-605 nm (TMR の蛍光波長) および 620-700 nm (SiR610 の蛍光波長) の 2 チャンネルの蛍光強度を測定して、そのレシオ値を用いることで、GSH 濃度の定量を行った。その結果、細胞種により定常状態の GSH 濃度が大き

く異なり、その値は既存法(細胞ライセートより求める手法)から求めた濃度と合致する結果となった(図 2d)。さらに、同じ細胞種の細胞であっても、細胞毎に GSH 濃度にばらつきがあることが示され、これは細胞や組織をすりつぶす系では得られない個々の細胞の情報を得られることを示す結果となった。さらに、本プローブの応答可逆性を活用することで、生細胞内 GSH 濃度変動を追跡できるか検討した。具体的には、QG3.0 を負荷した培養生細胞に、酸化ストレスの一種である過酸化水素を負荷し、その後洗浄除去する操作を行ったところ、過酸化水素添加後数十秒程度で GSH 濃度が低下し、洗浄後徐々に元の GSH 濃度まで回復することが示された。さらに、その GSH 濃度回復速度をがん細胞と正常細胞と比較すると、がん細胞は正常細胞に比べて速い回復を示し、グルタチオンリダクターゼによる GSSG の還元機能が亢進していることを直接的に示す結果となった。このように、QG3.0 を用いることで、酸化ストレス負荷による生細胞内 GSH 濃度変動をリアルタイムに追跡できることを示した。

以上の結果から、GSH との“分子間可逆的反応”を蛍光制御原理として開発した QG3.0 は、生きた培養細胞における GSH 濃度変化をリアルタイムかつ定量的に追跡できる蛍光プローブであることを実証した。

本成果は、原著論文として Nat. Chem. に採択された(研究成果リスト・論文 2)。また、QG3.0 は市販化され、国内外の幅広い研究者が利用できるようになった。

3. 今後の展開

研究テーマAで開発した SPiDER-βGal は、未固定の組織中における lacZ 発現細胞を1細胞レベルで蛍光検出可能であるという、従来のプローブにはない特長を有し、さらに最近、細胞老化マーカーである SA-βGal (senescence-associated-βGal) の検出にも使用できることが示された。従って、今後、様々な医学・生物学研究に用いられることで、病態や生命現象に関する新たな知見が得られることが期待される。また、構造展開により、プローブの多機能化が期待される。具体的には、長波長化や光増感剤への展開が挙げられる。キサンテン系色素の 10 位元素を酸素からケイ素に置換することで 100 nm 程度長波長化するという知見 (*Chem. Comm.* 2008, 15, 1780-1782) や、ゼレンに置換することで光増感剤として利用できるという知見 (*Bioorg. Med. Chem.* 2004, 12, 2537 - 2544) を活用することで、生きた組織中の lacZ 発現細胞を1細胞レベルで検出可能なβ-ガラクトシダーゼ活性検出“赤色”蛍光プローブや、lacZ 発現細胞特異的に細胞死を誘導可能な activatable 光増感剤が開発できると期待される。

研究テーマBで開発した QG3.0 は、従来までのプローブでは不可能であった、生細胞中の GSH の濃度の定量やその時間変化の追跡を可能とするプローブであることから、酸化ストレスに関わる基礎研究のみならず、細胞内 GSH 濃度と腫瘍細胞の悪性度、抗がん剤治療や放射線治療耐性との関連など、創薬研究や医療研究など幅広い分野への貢献が期待される。また、更なる構造展開により、励起・蛍光波長が異なる誘導体や、細胞内局在の異なる誘導体の開発ができることと期待される。

4. 評価

(1) 自己評価

・研究目的の達成状況

研究テーマAでは、分子内スピロ環化平衡による蛍光制御とキノンメチド化学を組み合わせることで、生きた組織中における lacZ 発現細胞を1細胞レベルで検出可能なβ-ガラクトシダーゼ活性検出蛍光プローブ SPiDER-βGal を開発した。研究テーマBでは、グルタチオン(GSH)の持つ高い求核性に着目し、キサンテン環の9位炭素への求核付加反応とそれに伴う可視光領域の吸収・蛍光特性の消失を蛍光制御原理として用いることで、生きた細胞内におけるGSHの濃度変動をリアルタイムかつ定量的に追跡できる蛍光プローブ QG3.0 を開発した。これらのプローブは、従来までのプローブの単なる改良ではなく、有機化学的な観点から精巧な化学修飾を施すことで、従来までのプローブを遥かに凌駕する性能を初めて達成することができたと考えている。開発したプローブの実用性の高さは、学会や学術論文で発表するやいなや多くの共同研究の申し込みがあったこと、既に市販化されるにいたったことが証明しており、いくつかの共同研究では、従来の技法で得られる結果とは一線を画す結果が得られている。これらの成果は、当初目標としていた計画をはるかに上回る成果であったと考えている。

・研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

本研究は、東京大学 大学院医学系研究科 生体情報学分野(浦野泰照教授研究室)で実施した研究であり、研究実施体制としては、研究代表者が研究の計画・とりまとめを行い、教室に所属する博士研究員2名および大学院生4名とともに実施した。また、ショウジョウバエ組織への適用実験は、東京大学薬学系研究科・三浦正幸教授ら、マウス脳スライスへの適用実験は、基礎生物学研究所 野田昌晴教授・檜山武史助教らとの共同研究成果である。

研究費は、有機合成にかかる試薬・消耗品類の他、プローブの機能検証実験や細胞実験のための備品・試薬・測定機器周辺の消耗品類の他、共同実験および学会発表のための旅費として使用した。

・研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)

上述の通り、本研究で開発したプローブ(SP iDER-βGal、QG3.0)は既に市販化されており、従来の技法では得られなかった結果を生み出す性能を有していることから、科学界への波及効果は高いと考えている。また今後さらに機能の多様化、分子構造の最適化を行うことで、より多様な機能を組織中の1細胞レベルで実現することができると期待される。つまり、本研究で確立した分子設計法に則り開発したプローブ群を医学・生物学研究に用いることで、病態や生命現象に関する新たな知見が得られることが期待される。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)

従来の酵素活性検出用の小分子蛍光プローブは酵素との反応生成物である蛍光色素が細胞内から拡散するため組織中の1細胞レベルの空間分解能で、酵素を発現する細胞の特定やその機能を解析することは困難でした。神谷研究者は反応前は蛍光性・細胞内滞留性もないが、β Galactosidase を発現している細胞内では反応して蛍光性と細胞内滞留性を同時に獲得する小分子蛍光プローブ SPiDER-β Gal を開発しました。本プローブは、固定組織のみならず

らず、未固定の脳スライス中の lacZ 発現細胞を蛍光検出し、蛍光シグナルを指標に電極を刺して電気生理実験を行うことができました。また、時々刻々と変化する細胞内のグルタチオンの酸化還元状態を1細胞レベルで可逆的にリアルタイムに定量的に検出する波長変化型蛍光プローブ QG3.0 を開発しました。これらの特許出願、さらには試薬メーカーからの上梓など、成果の実用化への展開も十分評価に値します。昨年度のさきがけ1期生の評価を行った際に、これらの傑出した業績に対し、1期生のライジング・スター賞を贈りました。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- | |
|--|
| 1. Doura, T., Kamiya, M.* , Obata, F., Yamaguchi, Y., Hiyama, T. Y., Matsuda, T., Fukamizu, A., Noda, M., Miura, M., Urano, Y.* Detection of LacZ-Positive Cells in Living Tissue with Single-Cell Resolution. <i>Angew. Chem. Int. Ed.</i> 2016, 55, 9620-9624. (責任著者論文) |
| 2. Umezawa, K., Yoshida, M., Kamiya, M.* , Yamasoba, T., Urano, Y.* Rational design of reversible fluorescent probes for live-cell imaging and quantification of fast glutathione dynamics. <i>Nat. Chem.</i> 2017, 9, 279-286. (責任著者論文) |
| 3. Yogo, T., Umezawa, K., Kamiya, M. , Hino, R., Urano, Y.* Development of an Activatable Fluorescent Probe for Prostate Cancer Imaging. <i>Bioconj. Chem.</i> 2017, 28, 2069-2076. |
| 4. Chiba, M., Ichikawa, Y., Kamiya, M. , Komatsu, T., Ueno, T., Hanaoka, K., Nagano, T., Lange, N., Urano, Y. * An Activatable Photosensitizer Targeted to γ -Glutamyltranspeptidase. <i>Angew. Chem. Int. Ed.</i> 2017, 56, 10418-10422. |
| 5. Iwatate, R. J., Kamiya, M. , Urano, Y.* Asymmetric Rhodamine-Based Fluorescent Probe for Multicolour In Vivo Imaging. <i>Chem. Eur. J.</i> 2016, 22, 1696-1703. |

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 1件(非公開)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

1. 神谷 真子、浦野泰照、組織中 lacZ 発現細胞のライブ検出を可能とする蛍光プローブの開発日本薬学会 第137年会、2017年3月26日、仙台国際センター・宮城県仙台市(招待講演)

受賞

1. 「日本薬学会奨励賞」(2016)
2. 「科学技術分野の文部科学大臣表彰 若手科学者賞」(2016)

プレスリリース

1. 「化学の力で見たい細胞だけを光らせる～遺伝学・脳科学に有用な画期的技術の開発～」(2016年7月)

<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20160708-2/>

2. 「生きた細胞内のグルタチオンを可視化し、定量する～がん治療研究や創薬研究への応用に期待～」(2016年11月)

<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20161108/index.html>