

論文の内容の要旨

論文題目 光誘起電子移動を制御機構とした
環境感受性蛍光プローブの開発とその応用

氏名 砂原 一公

【序論】

環境感受性蛍光プローブは、化学構造の変化を伴うことなく周辺環境に応じてその蛍光特性が変化する蛍光色素である。これまでタンパク質や細胞膜を標的に使われてきたが、励起波長が短いものが多く、細胞に与える障害を考えると細胞イメージング用蛍光プローブとして応用するには新たなプローブの開発が必要である。しかし環境感受性蛍光団の蛍光変化に対する知見は乏しく、新しいプローブの開発には試行錯誤が要求される。一方、当教室では光誘起電子移動 (PeT) を消光原理とした蛍光プローブの論理的設計法を確立し、さまざまな標的に対する蛍光プローブの開発に成功している。これらの蛍光プローブは標的分子と特異的に反応・結合することで化学構造が変化し、それに伴い電子密度が大きく変化することで蛍光が off から on へと変化する。

私はベンゼン環部位の HOMO エネルギーを変化させた種々の boron dipyrromethene (BODIPY) 誘導体を合成し、その蛍光特性を精査することで、溶媒の誘電率に依存して蛍光 on/off の境界が変化することを見出した (Figure 1)。具体的には、CH₃CN 中では **3**、**7** は蛍光を発し **9**、**11** は無蛍光であるが、溶媒を CH₂Cl₂ とすると **3**、**7**、**9** は蛍光を発し **11** は無蛍光へと変化する。さらに Benzene 中においては **3** から **11** のすべてが蛍光を持つようになる。このように PeT を用いることで系統的に環境感受性蛍光プローブの開発が可能となった。

本研究ではこの知見に基づき、PeT を用いて蛍光特性を制御した環境感受性蛍光プローブの開発とその応用を行った。

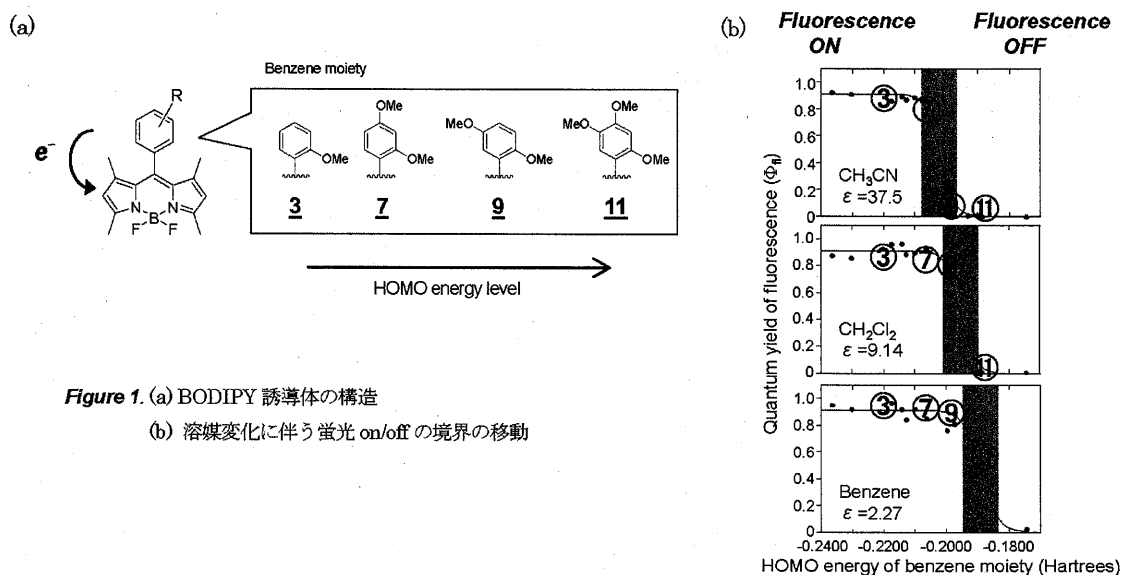


Figure 1. (a) BODIPY 誘導体の構造

(b) 溶媒変化に伴う蛍光 on/off の境界の移動

【本論】

1. タンパク質表面環境の測定

BODIPY を蛍光団とした環境感受性蛍光プローブは溶媒中では劇的な蛍光強度変化を示した。そこで生物試料への応用としてまず、蛍光 on/off 境界の異なる蛍光プローブを用いて BSA 表面環境の検出を試みた。BSA 添加による蛍光強度変化を示す (Figure 2)。7、9 では BSA 添加により蛍光上昇が観察され、3、11 では蛍光変化はほとんど見られなかった。極大吸収波長のシフトから (Table 1)、いずれの化合物も BSA との相互作用は確認される。7、9 では水中から BSA 表面の疎水的環境へと変化したことを検出して PeT の解除により蛍光強度が上昇したと考えられる。一方 3 は PeT が起こらず、11 では PeT が起こりすぎて BSA の表面環境では消光解除されなかったと考えられる。

以上の蛍光特性変化と、各溶媒で示す蛍光 on/off 境界 (Figure 1b) を比較することにより、BSA 表面環境は acetone 程度と見積もられた。これは蛍光 on/off を調節した化合物を作成できるようになり、ライブラリーとして応用することで得られた結果である。

このように、生物試料への応用が可能であることが確認され、また PeT により蛍光制御することでその周辺環境に適切な蛍光プローブを選択することができるが示された。次にこれを利用したセンサー分子の開発について述べる。

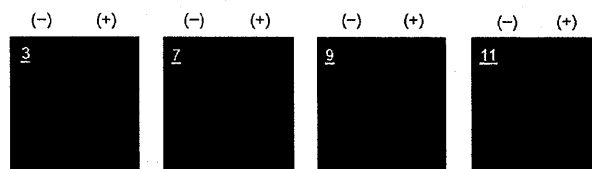


Figure 2. BSA の有無による BODIPY 誘導体の蛍光変化

Table 1. BSA の有無による BODIPY 誘導体の分光学的性質

	3		7		9		11	
	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
λ_{abs} (nm)	498	505	498	505	499	505	499	505
λ_{em} (nm)	510	513	512	515	n.d.	515	n.d.	516
Φ_f	0.871	0.330	0.020	0.218	0.002	0.187	0.001	0.023

2. グルタミン酸可視化蛍光バイオセンサーの開発

L-グルタミン酸 (Glu) は中枢神経系において主要な興奮性神経伝達物質であり、学習・記憶や神経細胞死などの重要な働きを担っている。グルタミン酸自体の検出法はさまざまあるが、イメージングに使えるプローブの報告例はほとんどない。そこで生細胞でグルタミン酸を特異的かつリアルタイムに検出するセンサー分子の開発を行った。

共同研究先の廣瀬研究室ではグルタミン酸受容体 (GluR) を直接利用し、これに蛍光プローブをラベルしたバイオセンサーを開発している。一般にバイオセンサーは、標的分子と結合すると大きく構造が変化するタンパク質を用いており (Figure 3a)、その結合部位の近傍に環境感受性蛍光プローブがラベル化されている。標的分子の結合前、蛍光プローブは親水的环境により消光しているが、標的分子との結合によりタンパク構造が変化して疎水的环境へと変化することで蛍光を発するようになる。しかしながら GluR はグルタミン酸の結合による構造変化が小さいことが知られており、環境感受性蛍光プローブをラベルしてもその蛍光変化が小さく、蛍光上昇は 30%程度である。これは環境変化に合った適切なプローブではないからであると考えて、より蛍光強度変化の大きなセンサー分子とするために PeT により蛍光 on/off の境界を調整した化合物を種々合成し網羅的に検討した。

長いリンカー、短いリンカーを持つ誘導体の合成、市販品の検討、さらなる合成展開を繰り返し検討した。その結果、**25** を GluR にラベル化したセンサー **ER-25** (Figure 3b) が最も大きな蛍光変化 (75%上昇) を示した。一方、比較対象として類似構造 **D20350** をラベルした **ER-D20** では PeT は起こらないが 20%の蛍光上昇を示した。この蛍光上昇の差である 55%は Glu 添加によるタンパク質の微小な構造変化を **25** が検出して、PeT が解除されることに由来すると考えられる。

この **ER-25** のセンサーとしての機能評価を行った。Glu 添加による吸収スペクトルの変化および励起・蛍光波長 (ex. 508 nm, em. 518 nm) の変化はなく蛍光強度のみが上昇した (Figure 4a)。Glu 濃度に依存した蛍光強度変化より解離定数 K_d を算出したところ **ER-25** で 944 nM、**ER-D20** で 323 nM であり (Figure 4b)、未ラベル体の K_d (480 nM) に匹敵することからラベルしたプローブは Glu 結合を妨げないことが示された。また今回用いた GluR は AMPA 型受容体に分類されるため AMPA と結合して蛍光上昇を示した以外は、その他のリガンドによる蛍光変化がないことから高い選択性が保たれていることが示された (Figure 4c)。最後に **ER-25** を神経細胞表面へと固定し、シナプス間隙の Glu イメージングを行った。電気刺激に伴う Glu 放出による蛍光上昇の検出に成功した。

このように、環境感受性蛍光プローブの蛍光特性を PeT で制御することにより、受容体の機能を損なうことなく蛍光強度のみを大きく変化させたバイオセンサーの開発に成功した (Figure 5)。

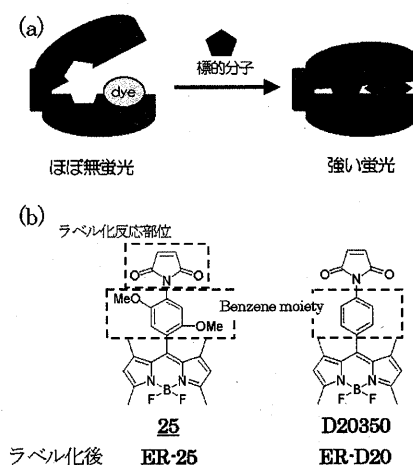


Figure 3. (a) 一般的なバイオセンサーの模式図
(b) BODIPY 誘導体の構造

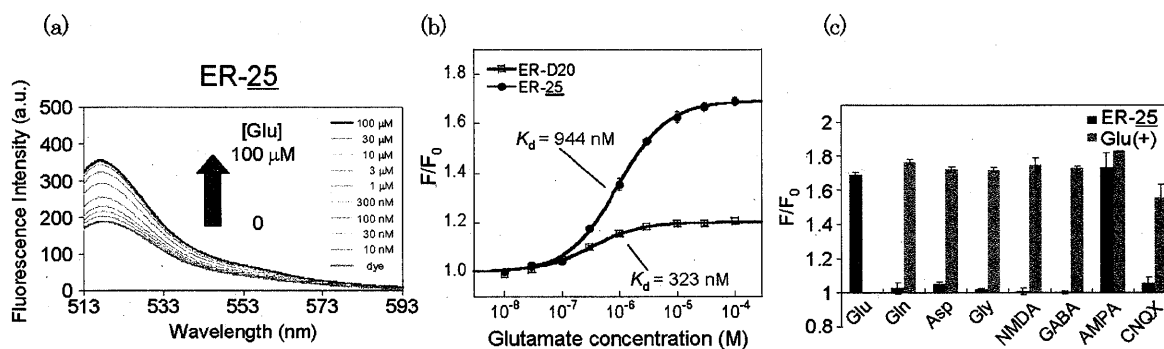


Figure 4. (a) Glu 添加による蛍光スペクトル変化 (b) 用量反応曲線 (c) 各リガンドに対する選択性

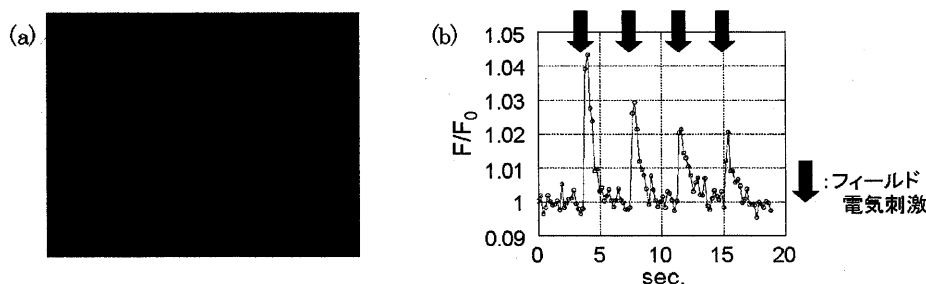


Figure 5. (a) 神経細胞表面に固定化した ER-25 の蛍光イメージング像 (b) 電気刺激に伴う Glu の蛍光検出

3. 蛍光制御した新規 HaloTag リガンドの開発

タンパク質の細胞内局在や動的挙動を解析する手法として近年、プロメガ社が HaloTag テクノロジーを開発した。これは無蛍光性の HaloTag タンパク質と蛍光色素から成る HaloTag リガンドとの結合を利用したタンパク質の蛍光標識技術のことである。代表的な蛍光タンパク質である GFP と比較して、経時的な観察において多重染色が容易に行える点で魅力的であるが、現在、市販の緑色リガンドである diAcFAM は未ラベル体の wash がされにくく S/N 比が悪いという問題点がある。そこで環境感受性蛍光プローブの利用を考えた。ラベル前は PeT により消光しており、ラベル化されてタンパク質表面の環境を検出して初めて蛍光を発することができれば、S/N 比よい観察が期待できる。

既存のリガンド diAcFAM を参考に BODIPY を蛍光団とする新規 HaloTag リガンドをデザイン・合成した (Figure 6)。HaloTag タンパク質との結合に必要な Reactive linker を持ち、ベンゼン環部位には異なる置換基を有する化合物を合成した。これらについて各溶媒による蛍光測定を行ったところそれぞれ異なる蛍光 on/off の境界を示した (Figure 7)。27 はどの溶媒においても蛍光を発するが、28 は DMSO ($\epsilon=48.9$) より高極性では無蛍光であり、29 は CH₂Cl₂ ($\epsilon=9.14$) より高極性では無蛍光であった。次に HaloTag タンパク質を発現した HeLa 細胞をリガンド標識後、細胞を固定化し顕微鏡で観察した (Figure 8)。その結果、視野全体に広がった細胞のうち限られた細胞のみが染色されたことから、新規リガンドは HaloTag タンパク質に認識されることが強く示唆された。また 28 と 29 の間には蛍光強度の違いが観察された。PeT の起こりやすい 29 で蛍光が弱いことはタンパク質表面環境を認識しても十分に消光解除されなかったことを示唆しており、狙い通りの機能を有していることが明らかとなった。

最後に diAcFAM との比較を行った。**28** は HaloTag タンパク質を発現した細胞だけが光っているのに対し、diAcFAM ではその周りの細胞からの蛍光も観察された(Figure 9)。このように新規に開発した蛍光制御した HaloTag リガンドによって S/N 比よく観察することに成功した。

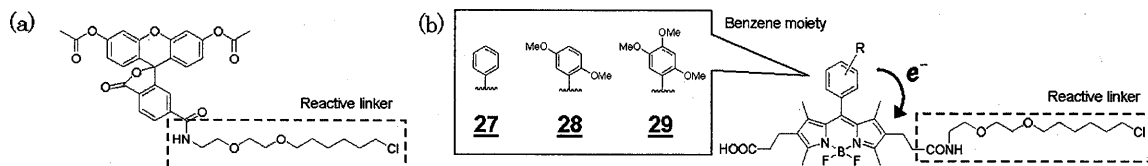


Figure 6. (a) diAcFAM の構造 (b) デザインした新規 HaloTag リガンドの構造

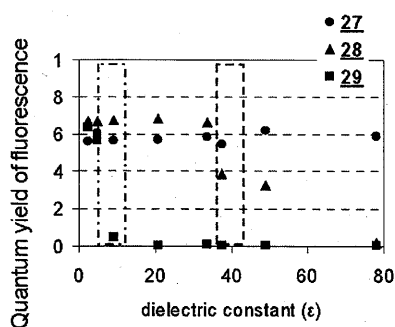


Figure 7. (a) 各リガンドの蛍光 on/off 環境の変化
27 は常に蛍光であり境界がないので、
28(---)、**29**(---)のみ示す。

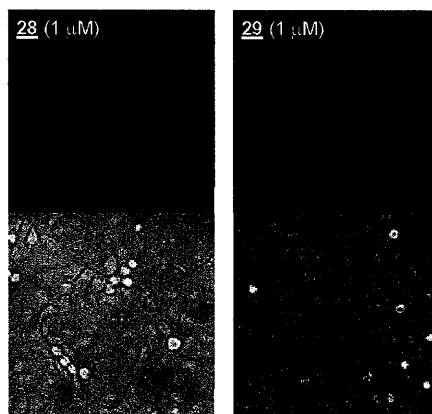


Figure 8. 各リガンドをロードした HeLa 細胞
 のイメージング
 (上) 蛍光像 (下) 透過像



Figure 9. バックグラウンド
 蛍光の比較

【結論】

PeT により蛍光制御を可能とした環境感受性蛍光プローブの開発とその応用を行った。蛍光 on/off の境界を変化させた蛍光プローブを系統的に合成できるようになり、ライブラリーとして用いることでタンパク質(BSA)の表面環境の見積りに成功した。また適切なプローブを選択することで、(1)イメージングを可能とする波長と蛍光強度変化を有するグルタミン酸可視化蛍光バイオセンサーの開発、(2)既存のリガンドより有用な新規 HaloTag リガンドの開発に成功した。本研究により、環境感受性蛍光プローブの PeT を利用した設計法とさらなる応用の可能性を示すことができた。