

平成 30 年 4 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K13093

研究課題名(和文)植物細胞内への機能性小分子送達技術の開発

研究課題名(英文) Development of novel methods for efficient delivery system of functional molecular probes in plant cells

研究代表者

高岡 洋輔 (Takaoka, Yousuke)

東北大学・理学研究科・講師

研究者番号：80599762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：動物細胞で有用な蛍光小分子インジケータの多くは、植物細胞では細胞壁を通らないか、液胞にたまってしまつたために細胞内局在制御が困難である。本研究では、セカンドメッセンジャーの代表格であるカルシウムイオンを植物細胞内で可視化するため、小分子カルシウムインジケータをサイトゾルへ送り届ける化学的戦略として、タンパク質リガンドを導入したリガンド連結カルシウムインジケータを開発し、これを用いてモデル植物細胞内でのカルシウム動態の可視化に成功した。この成果は、様々な機能性分子を植物細胞内に送り届ける基盤技術として発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：In plant biology, calcium ions are involved in a variety of intriguing biological phenomena as a secondary messenger. However, most of conventional calcium indicators are not applicable for plant cells partially due to the cell wall and vacuole as the specific organelle of plant cells. Therefore, for broad application with various plants in which genetic transformation is presently infeasible, useful synthetic indicators that localize in the cytosol are highly desirable.

In this research, we developed a ligand-tethered calcium indicator suitable for applications in plant cell biology by using a natural product-based ligand of cytosolic protein. This probe showed efficient cell permeability and localized within the cytosol and nucleus by means of ligand-protein interaction, and thus enabled spatiotemporal monitoring of calcium ions in the model plant cells.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：ケミカルバイオロジー ライブセルイメージング 細胞内分子送達

### 1. 研究開始当初の背景

生命現象を分子レベルで理解する上で、細胞内/個体内で起こっているシグナル伝達ネットワークを、リアルタイムで時空間的に可視化する技術は必要不可欠である。ただし、これを実現するためのツールとして、動物細胞では当たり前利用されている各種小分子センサー分子が、植物細胞では実用性に欠けることが多く、植物における動的なシグナル伝達挙動はほとんど解明されていないと言わざるを得ないのが現状である。その理由は、植物細胞特有の組織/小器官としての(1)細胞壁による小分子センサーの細胞透過性の低さと、(2)細胞内栄養貯蔵庫でもある巨大な液胞への疎水性分子の吸着である。このような植物細胞では、主にシグナル伝達が起こる細胞質や核、ミトコンドリアといった細胞小器官に、小分子センサーを送り届ける新たな方法論の開発が望まれている。

### 2. 研究の目的

申請者は「植物細胞内小器官に機能性小分子を送達する」新たな分子設計指針を確立し、セカンドメッセンジャー等の生理活性物質を時空間的に可視化する蛍光ケミカルセンサー開発に繋げることを目標として研究を行った。具体的には、セカンドメッセンジャーの代表格であるカルシウムイオンに焦点を当て、植物細胞内カルシウム動態の可視化を第一の目標に据え、研究を開始した。

### 3. 研究の方法

申請者はこれまでに、動物細胞をモデルとして、細胞内で標的タンパク質のみを可視化、あるいはその活性を制御するための細胞内タンパク質の選択的ラベル化法の開発に従事してきた。この過程で大きな障壁となったのは、分子プローブの細胞内局在の制御であったが、プローブの会合特性や分子全体の親水性・疎水性のバランスを調節することで、化合物の細胞内挙動を制御できることを実証してきた。これらの知見をもとにすると、「細胞内の特定タンパク質を分子プローブでターゲティングする」ことに立脚した一連の研究は、上記に挙げた植物細胞での分子プローブ開発の問題点を打破できる可能性がある。なぜなら、細胞内タンパク質への特異性はそのリガンドによって担保されると同時に、分子全体の親水性/疎水性バランスの調節で、細胞壁を透過しうる新たな分子設計が可能と考えられるからである。すなわち、望みのシグナルを可視化する蛍光センサーに、植物細胞内オルガネラ局在性タグを導入できれば、細胞内へ透過しつつ各種オルガネラに留める事ができると着想した。

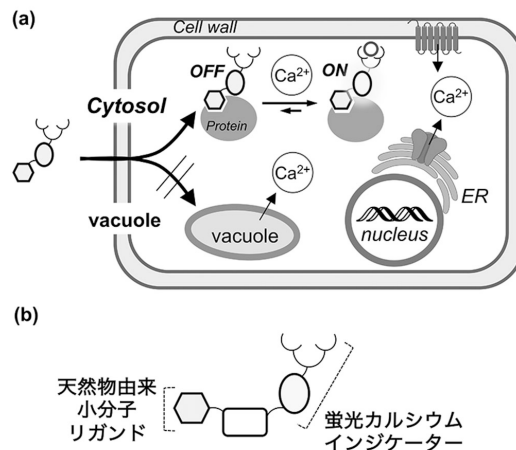


Figure 1. (a) リガンド連結カルシウムインジケーターによる植物細胞内でのカルシウムイオン動態の可視化. (b) リガンド連結カルシウムインジケーター (SLF-CaGreen-1) の模式図.

### 4. 研究成果

#### (1) 小分子リガンド連結カルシウムインジケーターの開発

具体的な化学プローブの分子設計をFigure1に示す。細胞内局在の制御が難しいカルシウムインジケーターを、目的の細胞質に留める戦略として、細胞質に発現しているタンパク質と、それに対応する小分子リガンドとの特異的な分子認識を利用することにした。すなわち、「小分子リガンドを連結したカルシウムインジケーター」を細胞内に導入できれば、小分子が細胞質タンパク質に認識されることでその局在を制御できる。この戦略で用いる分子には、(1)細胞質に存在するタンパク質が標的で、(2)タンパク質-小分子リガンドのペアが十分に特異的で親和性が高く、(3)小分子リガンドの細胞透過性が高い、などの条件が求められる。ここでは、細胞透過性に優れタンパク質との親和性が比較的高いことが知られている天然由来の分子を活用した。具体的には、植物/動物に限らず普遍的な発現が知られる細胞質タンパク質 FKBP12 を標的に、免疫抑制剤 FK506 の合成アナログ (SLF) をリガンドとして選択した。この SLF に、市販のカルシウムインジケーターの一つであるカルシウムグリーン 1 (CaGreen-1) を有機合成的に連結した化合物を合成し、モデル植物培養細胞 (タバコ由来 BY2 細胞) での検証を行った。まず、SLF と CaGreen-1 との間のリンカー構造を 3 種類検討したところ、リンカー長が短くても長くても全く細胞壁を透過することはなかったが、エチレングリコールが 3 回繰り返された中間の長さの分子だけが、細胞壁を透過した。ただしその局在は、残念ながら当初から懸念した「液胞」であった。これ

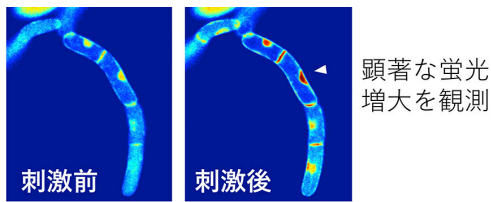


Figure 2. リガンド連結カルシウムインジケータによるタバコ培養細胞 BY2 内での、カルシウムイオノフォア刺激前後におけるカルシウムイオン動態変化の可視化。

は、タバコ由来 FKBP12 の発現量が導入された分子数よりも少なく、局在を制御しきれなかったと考えられたため、次にヒト FKBP12 を過剰発現させた BY 2 を用意し、同様の評価を行った。その結果、プローブは細胞質と核に局在化した (Figure 2: 刺激前)。この局在は FK506 との同時添加で再び液胞に変化したことから、この分子は FKBP12 によって細胞質に局在制御できることが示された。このプローブを用いて、カルシウムイオノフォアによる細胞質へのカルシウム流入の可視化にも成功しており (Figure 2: 刺激後)、今後様々なシグナルに応じた植物細胞などのカルシウムイオンの動態が可視化されることが期待される。

## (2) 小分子リガンド連結カルシウムインジケータの物性評価と新たな知見

前述の通り、SLF-CaGreen-1 は、小分子リガンドとインジケータの二つのユニット間のリンカーの長さが短いもの (エチレングリコール: EG1, 1a)、長いもの (EG5, 1c) は共に細胞に導入されず、中間のもの (EG3, 1b) のみが細胞導入された (Figure 3)。この要因は当初不明であったが、疎水性リガンドの SLF と親水性金属配位子を有する CaGreen-1 で構成されるこれらの分子が両親媒性であることを鑑み、これら分子の会合特性を評価することにした。具体的にはこれらプローブを水溶液に溶解させ、動的散乱測定 (DLS) を行ったところ、いずれも高濃度では明確な散乱が見られ、粒径 100-200 nm の会合体を形成していることが示唆された。その臨界凝集濃度 (Critical aggregation concentration, CAC) を比較すると、1a が約 1  $\mu\text{M}$ 、1c が約 5  $\mu\text{M}$  なのに対し、1b は約 10  $\mu\text{M}$  以上にならないと明確な散乱が見られなかった。また、細胞実験における低濃度条件では、1a、1c 共に会合体の存在が確認されたが、1b のみほとんど確認できなかったことから、1b は水中で会合体を形成しづらくモノマー分散しやすいことから、他に比べて細胞透過性が比較的高いことが示唆された。これらの知見は、リガンド連結カルシウムインジケータの分子設計において、会合特性が低いことも重要であること

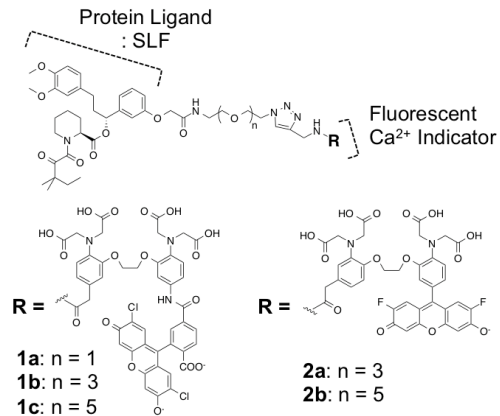


Figure 3. リガンド連結カルシウムインジケータの化学構造式。

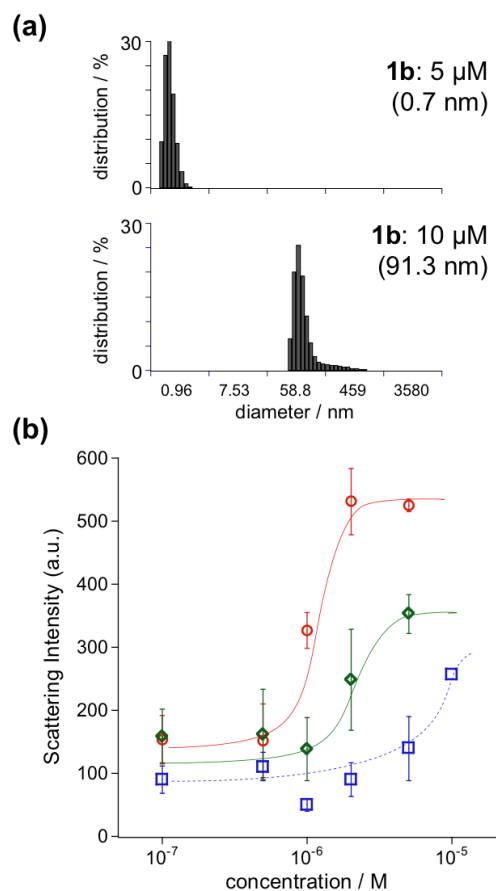


Figure 4. (a) リガンド連結カルシウムインジケータ 1b の DLS 測定結果. (b) 1a (○), 1b (◇), 1c (□) の動的散乱強度。

を示している。

これらの知見をもとに、我々は植物細胞に有用な第 2 世代型リガンド連結カルシウムインジケータの開発にも着手した。CaGreen-1 は Ca イオン濃度の低い状態でもバックグラウンド蛍光が強いため、分子の局在を見るには都合が良かったが、Ca イオンの有無による蛍光変化率は低いいため、素早い Ca イオン動態を可視化するにはより S/N が高いプローブが望まれた。そこで、Ca イオンの有無で 100

倍程度蛍光増大が見込める、Fluo4 をインジケータ部分に据えたプローブを分子設計した。これに、従来と同様小分子リガンドの SLF を連結するのだが、ここで前述の第 1 世代型リガンド連結カルシウムインジケータを用いた際の知見：会合特性が細胞導入効率に影響を与えることを考慮して、SLF と Fluo-4 の間のリンカー部分を様々に用意し、分子全体として水中での会合特性を制御することにした。運良く、リンカーのエチレングリコール鎖が 5 個のもの (EG5, 2b) が、従来細胞導入された第 1 世代型プローブ 1b と同様の CAC (10  $\mu$ M 以上) であることが示唆され、Fluo-4 に変更しても同様に会合特性を制御できることが示唆された。

今後は、タンパク質リガンドとインジケータ部分のさらなる最適化によって、あらゆる植物細胞においてカルシウム動態を可視化できるプローブの開発を進めていく。と同時に、ここで得られた知見はカルシウムインジケータのみならず、様々な小分子蛍光プローブに応用可能であることが期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Yousuke Takaoka, Masaki Imai, Miyuki Shigenaga, Minoru Ueda  
Design and synthesis of a second-generation ligand-tethered calcium indicator for plant cell biology on the fundamental analyses of the structure and physiological property. *Tetrahedron* **73**, 3079-3085 (2017).
- ② Yousuke Takaoka, Yuuki Nukadzuka, Minoru Ueda, Reactive group-embedded affinity labeling reagent for efficient intracellular protein labeling. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **25**, 2888-2894 (2017).
- ③ 高岡洋輔、植物細胞内分子イメージングへの挑戦.  
化学と工業、73 巻、238-239 (2017).
- ④ Yousuke Takaoka, Miyuki Shigenaga, Yuuki Nukadzuka, Masaki Imai, Kei Saito, Ryosuke Yokoyama, Kazuhiko Nishitani, Minoru Ueda, Protein ligand-tethered synthetic calcium indicator for localization control and spatiotemporal calcium imaging in plant cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **26**, 9-14 (2016).

[学会発表] (計 7 件)

- ① ○糠塚祐希、高岡洋輔、大浦早紀、上田実 Reactive group-embedded reagent for

efficient receptor protein labeling 日本化学会第 98 春季年会 2018 年 3 月 20-23 日 日本大学理工学部 船橋キャンパス (千葉県船橋市習志野台) (口頭 B 講演)

- ② ○糠塚祐希、高岡洋輔、上田実  
Reactive group-embedded reagent for efficient intracellular protein labeling The 7th Junior International Conference on Cutting-edge Organic Chemistry in Asia 2017 年 10 月 31 日-11 月 1 日 蘭州大学 (中国甘肅省蘭州市) (口頭発表)
- ③ ○糠塚祐希、高岡洋輔、上田実  
Reactive group-embedded reagent for efficient intracellular protein labeling A3 アジア化学プローブ研究拠点事業若手研究者ミーティング 2017 年 7 月 12 日 東北大学青葉サイエンスホール (宮城県仙台市青葉区) (口頭発表)
- ④ ○糠塚祐希、高岡洋輔、上田実 反応基組み込み型天然物リガンドによる生細胞内タンパク質の効率的ラベル化 第 28 回万有仙台シンポジウム 2017 年 6 月 24 日 仙台国際センター (宮城県仙台市青葉区) (ポスター発表)
- ⑤ ○Yousuke Takaoka,  
Development of natural products-based chemical tools useful for plant cell biology 2016 年微化研シンポジウム (招待講演) 2016 年 7 月 28 日微生物化学研究所 (東京都)
- ⑥ ○今井真輝、重永美由希、糠塚祐希、石丸泰寛、斎藤圭、横山隆亮、西谷和彦、高岡洋輔、上田実 リガンド連結カルシウムインジケータによるタバコ由来培養細胞 BY 2 内での生細胞カルシウムイメージング 第 89 回日本生化学会大会 2016 年 9 月 25-27 日 東北大学川内キャンパス (宮城県仙台市青葉区) (ポスター発表)
- ⑦ ○今井真輝、重永美由希、糠塚祐希、石丸

泰寛、斎藤圭、横山隆亮、西谷和彦、高岡  
洋輔、上田 実 リガンド連結  $\text{Ca}^{2+}$  インジ  
ケーターによるタバコ由来培養細胞 BY  
2内での生細胞  $\text{Ca}^{2+}$  イメージング 第11  
回日本ケミカルバイオロジー学会年会  
2016年6月14-16日 京都テルサ（京都  
府右京区）（ポスター発表）

〔図書〕（計 0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.orgchem1.chem.tohoku.ac.jp/orgchem1/Home.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高岡 洋輔 (TAKAOKA, Yousuke)  
東北大学・大学院理学研究科・講師  
研究者番号：80599762

### (2) 研究分担者

該当なし ( )

### (3) 連携研究者

該当なし ( )

### (4) 研究協力者

該当なし ( )