

令和元年6月7日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19203

研究課題名（和文）一細胞代謝を可視化する蛍光プローブの開発

研究課題名（英文）Development of fluorescent probes for metabolic activity in single cell

研究代表者

王子田 彰夫 (Ojida, Akio)

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号：10343328

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、細胞内の代謝経路の活性化を蛍光検出できる新しい分子プローブの開発を行った。期間内では、脂肪酸ベータ酸化の活性化を蛍光増強で検出できる蛍光プローブの開発に注力した。代謝中間体として形成されるチオエステルの分子内環化反応を蛍光センシングシステムとするプローブをデザインして検討を行ったところ、実際に細胞内でベータ酸化を受けて環化反応体が生成することが明らかとなった。本成果は、今後に様々な中心代謝経路の活性化を検出できる蛍光プローブの開発を行う上で重要な基礎知見である。また、酵素反応によって自己開裂して蛍光変化を誘起できるリンカー分子の開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに様々な細胞イベントを検出できる蛍光プローブが開発されてきたが、代謝経路自体の活性化を検出できる蛍光プローブの開発例はほとんど報告されていない状況にあった。本研究では、様々な細胞内代謝経路を検出できる可能性を持つ新しいセンシング機構を提案し、実際にそれが細胞内で機能することを明らかにした。本研究から得られた知見は、様々な代謝経路の蛍光可視化する蛍光プローブの分子デザインに有用に知見を与えるものである。また将来的には、細胞代謝の蛍光解析の実現や代謝を標的とした薬剤分子のスクリーニングにも貢献することが期待できる。

研究成果の概要（英文）： In this research project, we developed the fluorescent probes that can detect the activity state of the metabolic pathways in living cells. In the research period, we focused on the development of the turn-on type fluorescent probe that can sense the activity of the fatty acid beta oxidation. The probe exploited the intramolecular cyclization of the metabolically produced thioester as a sensing mechanism. We confirmed that the probe was converted to the desired cyclized product as a result of beta oxidation and the subsequent intramolecular cyclization. This finding would provide molecular design basis for development of fluorescent probes that can detect the activity of other central metabolism pathways such as glycolysis and TCA cycle. We also developed the auto-immolative linker, which is useful in design of fluorescent probes for various enzyme-catalyzed reactions.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：蛍光プローブ 代謝 がん ベータ酸化

1. 研究開始当初の背景

生体分子の機能を生きた細胞内において可視化する蛍光プローブは、これまで生命機能の解明に大きく貢献してきた。例えば、細胞内カルシウムイオンや活性酸素種(ROS)などの生体分子種を検出可能な蛍光プローブ開発が、過去20年にわたり精力的に行われ、細胞機構を解明する分子ツールとしてすでに実用化がなされている。しかしながら、これらの分子プローブ開発は、既存のセンシング機構を用いて検出可能な一部の生体分子を対象としたものに限られており、多様な生体分子や生体反応に対する蛍光プローブのレパートリーは明らかに不足している。この状況は、代謝の研究領域においても同様である。すなわち、細胞代謝に関わる分子の産生や消費、あるいは代謝経路の活性化状態を細胞イメージングできる蛍光プローブはこれまでにほとんど開発されていない。このような状況の中で申請者は、細胞の主要な代謝を可視化できる新しい蛍光プローブの開発し、細胞代謝のケミカルバイオロジー研究を展開することを新たに着想した。現在、細胞の代謝研究は質量分析を用いたメタボローム解析が主流となっている。質量分析は、代謝産物の網羅的な検出を可能とする優れた手法であるが、個々の細胞の代謝をリアルタイムに検出することは本質的に困難である。一方で、本申請研究により開発される蛍光プローブは、イメージングにより、個々の細胞における代謝活性の違いや特徴をプロファイリングすることが可能であり、代謝研究の有用な解析法となり得る。本研究により開発される蛍光プローブは、ガンを含めた様々な疾患に関連する代謝研究の発展に貢献すると期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、細胞の様々な代謝経路の活性化をイメージングにより可視化できる新しい蛍光プローブの開発である。これにより個々の細胞の代謝活性の違いや特徴を明らかとし、ガンを含めた疾患に関連する代謝研究の発展に貢献することを目指す。本研究では、新しい蛍光センシング機構の開発に基づいて、主にこれまでに蛍光イメージングされていない細胞の様々な主要代謝経路(解糖系、クエン酸回路、脂肪酸ベータ酸化、コレステロールの生合成等)の活性化状態をリアルタイムに可視化できる蛍光プローブの開発について検討を行う。本研究により開発される蛍光プローブは、代謝活性を一細胞ごとにプロファイリングすることを可能とし、細胞代謝のケミカルバイオロジー研究を切り拓く新しい解析ツールとなり得ると期待できる。

3. 研究の方法

本研究では、一つ目の研究テーマとして、形成されるチオエステルに着目した代謝活性センシングについて検討を行った。多くの主要代謝経路においては、一連の酵素反応により反応活性なチオエステル中間体が形成される。このチオエステル中間体を化学反応によりトラップすると同時に蛍光変化が起こるセンシング機構を蛍光プローブに組み込むことで、対象となる代謝経路の進行を蛍光変化により検出することが可能となる。本研究では、このようなセンシング機構として、アニリン型プローブのチオエステル環化反応による光誘起電子移動(PET; photo-induced electron transfer)の解消を採用した。すなわち、アニリン型プローブ自体は、電子豊富なアニリン環からのPET消光により蛍光オフ状態にあるが、チオエステルとの環化により酸化電位が上昇してPETが生じなくなることで蛍光が増強するセンシング機構である。

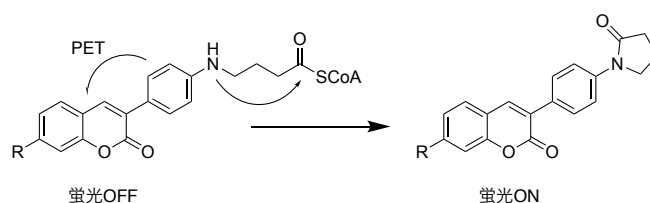


図1. 代謝中間体であるチオエステルの環化反応を利用した蛍光センシング

一方、本研究では、様々な代謝反応を検出できる蛍光プローブデザインの多様性を広げる目的で酵素反応後に自己開裂を起こすリンカー (auto-immolative linker) の開発を進めた。代謝に関わる酵素の基質選択性は高いことが多いため、デザインした蛍光プローブが基質として認識されず機能しない問題がある。自動開裂型リンカーを蛍光プローブと酵素反応部位との間に挟むことで、この問題を軽減することが可能となる。

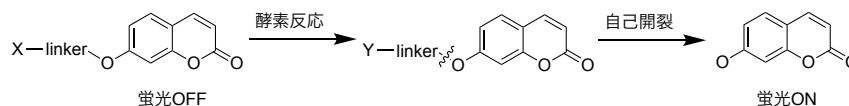


図 2. 自己開裂型リンカーを利用した酵素反応の蛍光センシング

4. 研究成果

(1) チオエステル環化反応を利用した脂肪酸ベータ酸化反応の検出

本研究では、当研究室で先行して代謝イメージング研究が進んでいる脂肪酸ベータ酸化の検出を目的とした検討を行った。まず初めに、モデル化合物としてアミノクマリンを蛍光団として持つチオエステル誘導体を合成し、蛍光特性の評価を行った。その結果、環化前駆体 **1** は中性水溶液中で、ほとんど蛍光を発しない一方で、環化体 **2** は目的どおり強い蛍光を発することを確認した (図 3a)。次に環化反応の速度を蛍光スペクトル法により評価したところ、半反応時間にして 10 分程度で素早い環化反応が進行することを明らかとした (図 3b, c)。

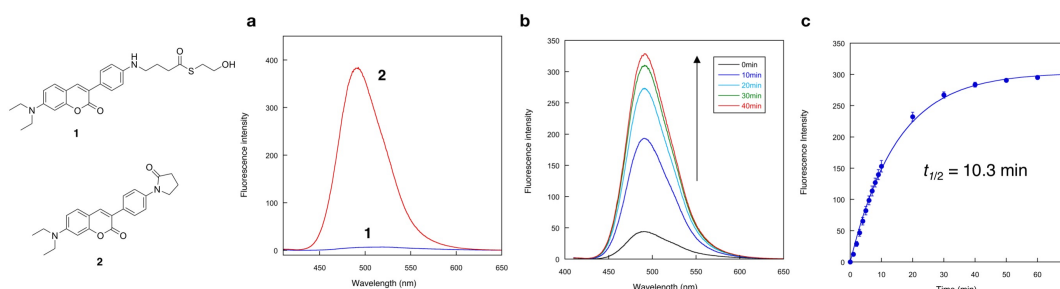


図 3. クマリン誘導体の蛍光および環化反応特性

次に長鎖アルキル基を持つベータ酸化プローブ **3** を HepG2 細胞とインキュベーションを行い、代謝反応により得られる生成物を HPLC および質量分析法を用いて同定した。その結果、プローブ **3** はベータ酸化反応による代謝中間体へと変換されるが目的とする環化体 **2** を与えなかった。次にクマリン蛍光団の構造を変えたベータ酸化プローブを複数合成して、細胞内における被代謝活性や環化体形成について検討を行った。その結果、ヒドロキシクマリン型の蛍光プローブ **6** において微量の環化体 **8** が生成することを HPLC により確認した (図 4a)。また、HepG2 細胞の用いた細胞イメージングにおいても環化体 **6** の形成に伴う蛍光増強を示唆するイメージング画像を得ることができた (図 4b)。一方でプローブ自体の極性の向上を狙って合成したアミノクマリン体 **4**, **5** やクマリン環上にフッ素基を導入した **7** では環化体の形成は確認できなかった。以上の結果は、ベータ酸化代謝や環化体形成の効率がプローブ構造に大きく依存することを示唆している。本研究については今後、環化体の形成効率がより高い蛍光プローブの開発を目指して研究を継続する予定である。

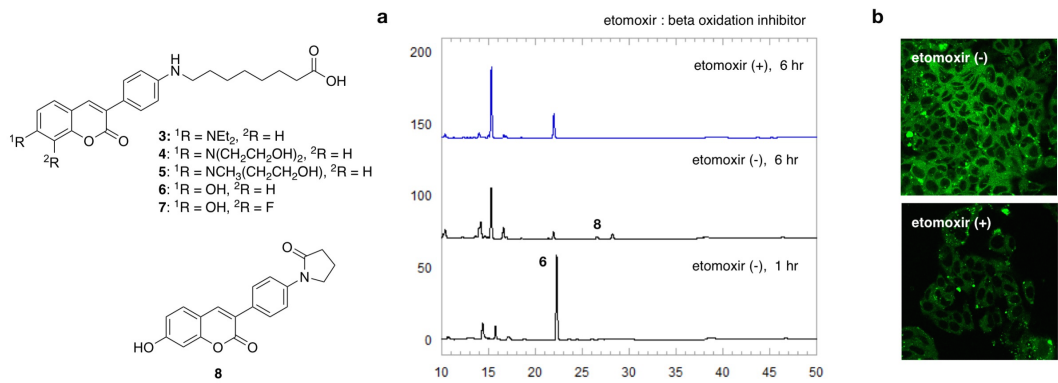


図 4. クマリン誘導体のベータ酸化代謝および環化反応

(2) 自己開裂を起こすリンカー (auto-immolative linker) の開発

本研究では、酵素反応によりカルボン酸が生じると同時に開裂を起こすリンカー構造の探索を、まずはじめに行った。Thorpe-Ingold 効果により加速される分子内環化を開裂反応として組み込んだリンカー分子を有するクマリン化合物を合成し、それらの開裂反応を蛍光スペクトル法により評価を行った(図 5)。その結果、自己開裂の反応速度はリンカーの構造に大きく依存し、**8** および **11** が極めて迅速にクマリンを放出できることを明らかとした。また、迅速な開裂反応を起こす **8** のリンカー-L8 は、カルボン酸のみでなく、水酸基あるいはアミンの形成によっても自己開裂を起こす幅広い応用性を持つリンカーであることを明らかとした。

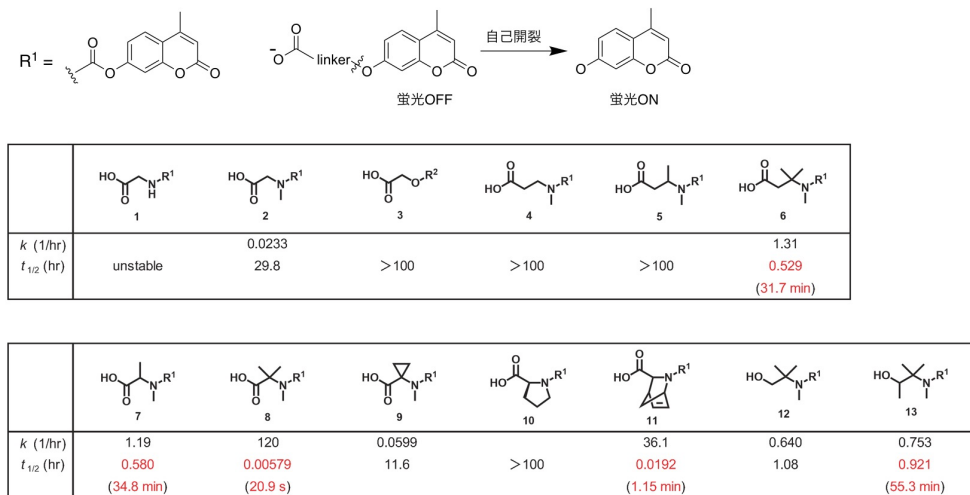


図 5. 自己開裂型リンカーの反応速度評価

自己開裂型リンカー-L8 を持つプローブを酵素反応の蛍光センシングへと応用した。例えばエステル型プローブ **14** は、ブタ肝エステラーゼによりエステル加水分解されることで 800 倍以上の大きな蛍光増強を起こした (図 6)。同様にリンカー-L8 を持つクマリン型プローブを用いることでカルボキシエステラーゼやトランスアミンナーゼの触媒する酵素反応を検出できることを明らかとした。今後は、開発した自己開裂型リンカーを様々な代謝酵素反応の蛍光センシングへと応用していく予定である。

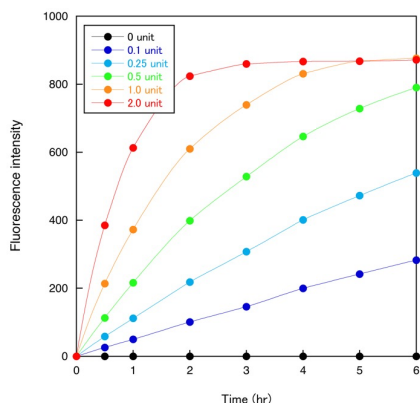
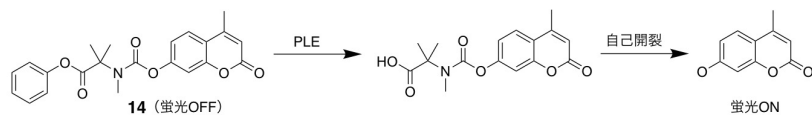


図 6. ブタ肝臓エステラーゼにより加水分解反応の蛍光センシング

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

1. R. Kawagoe, I. Takashima, S. Uchinomiya, A. Ojida, Reversible Ratiometric Detection of Highly Reactive Hydropersulfides Using a FRET-Based Dual Emission Fluorescent Probe, *Chemical Sciences*, 2017, 8,1134-1170.
2. J. Wongkongkatap, A. Ojida, I. Hamachi, Fluorescence Sensing of Inorganic Phosphate and Pyrophosphate Using Small Molecular Sensors and Their Applications, *Topics in Current Chemistry*, 2017, 1-33.

〔学会発表〕 (計 11 件)

1. 王子田彰夫, 新しいセンシング機構を組み込んだ蛍光プローブのデザインと応用, 第 30 回九州分析化学若手の会春の講演会 (招待講演), 2017 年
2. 内之宮祥平, 川越亮介, 中村範章, 王子田彰夫, 脂肪酸 β 酸化を検出するための基質型蛍光プローブの開発, 第 11 回バイオ関連化学シンポジウム, 2017 年
3. 王子田彰夫, 新しい蛍光プローブのデザインと応用, 2nd Symposium on New Trends of Nano- and Bio-Materials Design in Supramolecular Chemistry, 2017 年
4. 中村範章, 内之宮祥平, 王子田彰夫, カルボン酸の自発的脱離反応を利用した蛍光センシングシステムの開発, 第 5 回バイオ関連化学シンポジウム若手フォーラム, 2017 年
5. 中村範章, 内之宮祥平, 王子田彰夫, カルボン酸の自発的脱離反応を利用した蛍光センシングシステムの開発, 第 11 回バイオ関連化学シンポジウム, 2017 年
6. 中村範章, 内之宮祥平, 王子田彰夫, カルボン酸の自発的脱離反応を利用した蛍光センシングシステムの開発, 第 34 回日本薬学会九州支部大会, 2017 年
7. 中村範章, 内之宮祥平, 王子田彰夫, カルボン酸の分子内環化反応を利用した蛍光センシングシステムの開発と酵素反応検出への応用, 日本化学会第 98 春季年会, 2018 年
8. Shohei Uchinomiya, Ryosuke Kawagoe, Mark Weber, Mari Sakamoto, Akio Ojida, Development of a fluorescent probe for live-cell imaging of fatty acid beta oxidation, 日本化学会第 98 春季年会,

2018 年

9. 坂本茉莉, 川越亮介, Weber Mark, 内之宮祥平, 王子田彰夫、細胞内での β 酸化検出を目指した蛍光プローブの開発、第 55 回化学関連支部合同九州大会, 2018 年
10. 坂本茉莉, 川越亮介, Weber Mark, 内之宮祥平, 王子田彰夫、生細胞内での脂肪酸 β 酸化検出を目指した蛍光プローブの開発、第 35 回日本薬学会九州支部大会, 2018 年
11. 坂本茉莉・川越亮介・Weber Mark・鴨田光一郎・内之宮祥平・王子田彰夫代謝検出蛍光プローブの開発 (2) 代謝中間体の分子内環化反応を利用した β 酸化のイメージング、日本化学会第 99 春季年会, 2018 年

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

九州大学薬学研究院創薬ケミカルバイオロジー研究室ホームページ

<http://bunseki.phar.kyushu-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究分担者 なし

(2) 研究協力者 なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。