

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H04706

研究課題名(和文)機能性蛍光プローブ開発による骨細胞機能及び4Dヌクレオミクスイメージング

研究課題名(英文)Development of functional fluorescent probe for imaging osteocyte function and 4D nucleomics

研究代表者

菊地 和也(Kazuya, Kikuchi)

大阪大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：70292951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では機能性蛍光プローブをデザイン・合成し、生きた状態の細胞が有する生理機能の直接計測を行う。有機合成が得意とする多様な標的へ適した分子設計と、生物の直接計測技術を融合させることができ、本技術で初めて機能解析できる生命現象を明らかにすることを目的とした。具体的には、骨細胞機能を明らかにする二光子励起in vivoイメージングプローブの開発と、蛋白質の機能性分子ラベル化技術の開発によるゲノム動態可視化及びオルガネラ成熟時の局所pH計測プローブを行った。本成果により、生物個体の細胞機能解析への応用や、場所を特定した蛋白質の生体ラベル化法が可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は細胞や生体内の分子機能を生きた状態で観察するための化学プローブの開発を行うことで、初めて観察できる現象を捉えることを目的としている。そのため、化学を基にしたpHに応答し波長が変化する蛍光プローブ、標的蛋白質を速やかに長時間観察できるラベル化プローブを開発することに成功した。実際に、これらのプローブを用いて生きたマウス骨組織におけるpHの変化や、細胞内における蛋白質の移行過程を可視化することに成功しており、生物学、医学分野への貢献が期待できる成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed functional fluorescent probes to directly measure physiological functions of living cells. The aim of this project is to reveal biological phenomena that can be functionally analyzed for the first time with this technology by combining organic chemistry and cell biology. During this project, we have developed in vivo imaging probes that reveal osteocyte/osteoclast functions using two-photon excitation microscopy. Also, we have developed novel fluorescent protein labeling probes for visualizing genome and organelle dynamics. Our results have enabled applications to the analysis of cellular functions in living animals or protein dynamics in living cells.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：化学プローブ 蛍光イメージング 蛋白質ラベル化 破骨細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

蛍光イメージングは現在盛んに研究されている分野であり、蛍光プローブの論文は年々増えている。しかし、殆どの蛍光プローブは理想的な条件(試験管内の条件)では機能しても、細胞や動物個体などの実際に能力を発揮すべき条件では機能しない場合がほとんどである。この状況下、申請者は実際の応用条件において機能する分子プローブを作製してきた。この過程において、分光特性変化の大きさ、細胞内外へのデリバリーについて最適化を行い、分子デザインを深化させてきた。

例として破骨細胞の活性を検出する蛍光プローブ(pHocas 類)と二光子励起顕微鏡を用いたイメージング技術により骨組織上の細胞活性を生きたまま可視化することに成功し、破骨細胞の骨吸収活性およびその分子機構を明らかにしてきた(JACS, 133, 17772 (2010) Nat.Chem.Biol., 12, 579 (2016) ACS Cent.Sci., 5, 1059 (2019))。一方で、骨細胞は骨組織内で最も多く存在する細胞であり、骨基質中の骨小腔と呼ばれる空間に存在している。骨細胞は骨細管と呼ばれる管を通して骨細胞同士でネットワークを形成し、さらには骨組織上の破骨細胞や骨芽細胞とシグナル伝達を行っている。加えて古くから骨細胞自身が骨小腔内で酸性領域を作り出して骨吸収を行う機能が提唱され、その存在について議論されてきた。しかしながら、pHocas 類の蛍光プローブは骨表面上に分布するように設計されているため、骨細胞が存在する骨組織内部の骨小腔へとプローブを送達させることはできない。

また、我々はこれまでに、新たなタグ蛋白質として紅色硫黄細菌由来の小蛋白質である PYP タグを見出し、合成蛍光プローブにより、PYP タグ融合蛋白質を生細胞において特異的標識することに成功してきた(JACS, 131, 16610 (2009) JACS, 135, 12360 (2013) Nat.Chem.Biol., 12, 853 (2016))。さらに、蛍光スイッチモジュールに PYP タグリガンドを繋ぎ、PYP タグ融合認識モジュールを標識することで合成分子/蛋白質ハイブリッドプローブを生細胞内で構築する手法を考案し、DNA メチル化をイメージングすることに成功した(JACS, 140, 1686 (2018))。本手法で構築されるハイブリッドプローブの有用性と汎用性をさらに示す必要がある。

2. 研究の目的

本研究では有機合成が得意とする多様な標的へ適した分子設計と、生物の直接計測技術を融合させることで、本技術で初めて機能解析できる生命現象の解明を目的とした。すなわち、機能性蛍光プローブをデザイン・合成し、生きた状態の細胞が有する生理機能の直接計測を行うものである。具体的には、骨細胞機能を明らかにする二光子励起 *in vivo* イメージングプローブの開発と、蛋白質の機能性分子ラベル化技術の開発によるゲノム動態およびオルガネラ動態の可視化を行った。本成果により、生物個体の細胞機能解析への応用や、場所を特定した細胞内蛋白質のラベル化と動態解析が可能となる。

3. 研究の方法

in vivo イメージングプローブにおいては、骨組織における pH を定量的に計測するため、FRET に基づいた蛍光波長がシフトするレシオ型蛍光プローブの設計・および合成を行った。レシオ測定を用いる利点の一つはプローブ全体の分布(ドナー蛍光)と pH が低下している部分(アクセプター蛍光)を色分けして示すことができる点である。もう一つの利点は、到達度の差による染め斑による影響を無視して定量計測ができる点である。合成した pH プローブの pH 応答性、FRET の特性は分光学的な分析により評価した。また、実際の骨組織に結合した環境のモデルとして、ヒドロキシアパタイトに固定化した状態においても計測およびイメージングを行った。生体内骨組織の pH 検出に向けた実験として、マウスへレシオ型蛍光プローブを投与し、生きた状態で骨組織の二光子励起イメージングを行った。

蛋白質ラベル化プローブにおいては、タグ蛋白質を介して共有結合性のリガンドを有する蛍光プローブを開発し、核内ゲノム、細胞内オルガネラの動態変化のイメージングを行った。特に、タグ蛋白質への反応性と安定性において改良した新規リガンドを用いた蛍光プローブを合成した。蛋白質のラベル化は SDS-PAGE により確認し、蛍光特性は蛍光スペクトルによって測定した。生細胞への適用においては目的とするゲノムやオルガネラに発現する蛋白質をタグと融合した融合遺伝子を培養細胞内で発現させ、蛍光プローブによる標識後に蛍光顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

(1) 骨細胞機能を明らかにする二光子励起 *in vivo* イメージングプローブの開発

以前に開発した pH 応答性色素がスピロ環化による吸収の変化を示すことから、この色素を FRET のアクセプターとしてドナー色素を導入したプローブを設計・合成した。ドナー色素の蛍光とアクセプター色素の重なり積分は pH により変化し、中性 pH においては FRET が起こらずアクセプター側の蛍光は示さないが、酸性 pH においては FRET が起こりアクセプター側の蛍光増大とドナー側の蛍光減衰が見られると期待した。ドナー側の色素を検討し、より適した蛍光レシオ増大を示す色素の開発に至った。この色素に骨組織へと送達可能なビスホスフォネート基

を導入し、目的のプローブを完成させた。酸性～中性領域の各 pH で蛍光スペクトルを測定したところ、期待した通り pH 低下に伴いドナー側蛍光の減少とアクセプター側蛍光の増大が観察された。pKa の値は 4-5 の範囲にあり、破骨細胞が機能する際の pH 領域に合致していた。次にヒドロキシアパタイト粒子とプローブを混ぜ、粒子表面にプローブを結合させた状態で外液の pH を変えて蛍光イメージングを行った。その結果、スペクトルの結果と同様の蛍光シグナルの pH 応答性が確認された。

続いて生きたマウスを用いたイメージング実験を行った。プローブ投与後のマウスの頭頂骨部分の骨髓腔を二光子励起イメージングにより観察した。二光子励起の波長やイメージングの条件を検討したことで、骨組織由来の二次高調波シグナル、ドナー色素由来の蛍光シグナル、アクセプター色素由来の蛍光シグナルを分けて検出することができた。また、従来の activatable 型のプローブとは異なり、pH 応答性のないプローブを使わなくてもプローブの骨組織表面への分布を確認することができた。また、投与後の組織を取り出し、酸性および中性の pH において観察したところ、骨組織からの蛍光シグナルの波長が変化していた。これらの結果より、本プローブは生きたマウスの骨組織上で pH 変化を蛍光波長変化としてイメージングできることが示された。今後は各 pH における蛍光をキャリブレーションすることで、骨組織における pH を定量化して示す。加えて、本プローブのアクセプター色素の蛍光波長をシフトさせるような分子設計を行い、蛍光タンパク質でラベルした破骨細胞と同時に計測することを目指す。

(2) 蛋白質の機能性分子ラベル化技術の開発によるゲノムおよびオルガネラ動態の可視化

当グループではタグ蛋白質として PYP タグ、および β -ラクタマーゼ由来の BL タグを報告してきた。PYP タグは 7-ヒドロキシ桂皮酸およびクマリン誘導体のチオエステル、BL タグは β -ラクタム基質が対応するリガンドであるが、前者は細胞内グルタチオンへの耐性、後者は化学的な不安定性が課題であった。細胞内小器官の動態を可視化するためには細胞内環境で安定なプローブの開発が必要であり、リガンドの改良に着手した。

PYP タグに対する新たな合成リガンドとして、クロロアセチル基を中心にいくつかのリガンド候補を既存プローブとの競合実験、SDS-PAGE によるラベル化競合能の解析からスクリーニングした。その結果、PCAF (PYP ligand with chloroacetamide and trifluoromethyl) を優れた反応性とグルタチオン耐性を示すリガンドとして見出した。PCAF リガンドに様々な蛍光色素を連結し、多色でイメージング可能な一連の蛍光プローブ (PCAFGreen, PCAFOrange, PCAFRed, PCAFar-red) を開発した。これらの蛍光プローブは PYP タグを効率よく、急速にラベル化することができた。本手法を用いてゲノム、オルガネラ動態を観察するための PYP タグ融合遺伝子を作製した。その中で、GLUT4 のオルガネラ移行のイメージングについて興味深い知見が得られた。GLUT4 は以前のわれわれの研究結果から、糖鎖修飾が細胞膜と細胞内小胞の動態に影響を与えていることが分かっていた。この違いをより詳細に解析するため、細胞膜非透過性の PCAFgreen と細胞膜透過性の PCAFOrange の 2 種類の蛍光プローブを用いて GLUT4 をラベル化し、マルチカラーイメージングを行った。特に、正常な糖鎖修飾を示す野生型の GLUT4 と糖鎖修飾が起こらない変異型 GLUT4 (N57Q) において、細胞膜上および、細胞内の蛍光シグナルの分布が大きく異なっており、変異型 GLUT4 においては一時的にインスリン刺激で細胞膜上に現れた GLUT4 が即座に細胞内へ移行していた (Fig.1)。加えて、糖鎖欠損型の GLUT4 は細胞内においてリソソームに局在しており、リソソーム経路での分解により GLUT4 の品質管理を行っていることが示唆された (Chem. Sci. 14, 5925 (2023))。

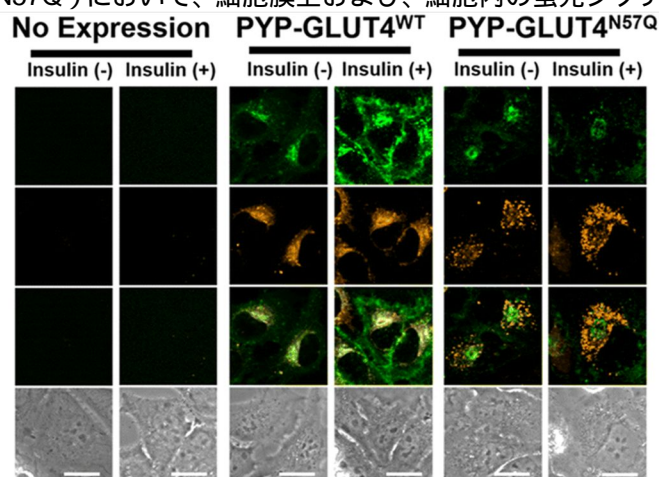


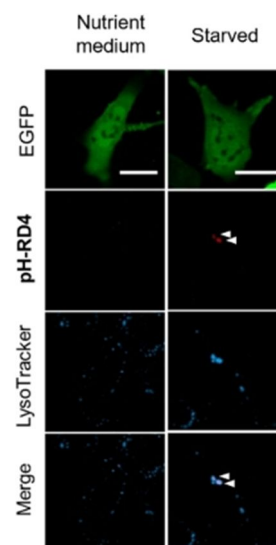
Fig.1 PCAF プローブによる野生型および変異型 GLUT4 の生細胞マルチカラーイメージング。スケールバーは 20 μ m を表す。

BL タグにおいては、新たなリガンドとしてジアザピシクロオクタン (DBO) 構造を有する阻害剤に着目した。この阻害剤は β -ラクタマーゼと安定な共有結合を形成することが知られている。そこで、蛍光性の DBO 阻害剤を新規蛍光プローブとして合成した。SDS-PAGE によりラベル化能を評価したところ、このプローブは β -ラクタマーゼと迅速にラベル化を起こし、長時間安定な複合体を形成することが示された。既存の阻害剤はアニオン性のスルホ基が含まれており、細胞膜透過性が著しく低いため、DBO 阻害剤のプロドラッグの構造を利用することで、細胞内蛋白質へと標的を拡張することとした。エステル部分の構造およびリンカーを検討することで、細胞内蛋白質を素早くかつ長時間ラベルできるプローブの開発に成功した。

本手法を用いたオルガネラ動態の可視化として、オートファジーにおける蛋白質のリソソーム移行と環境変化をイメージングした。リソソームは低 pH 環境であることが知られているため、pH 応答性の蛍光色素を DBO プロドラッグからなるリガンドに結合させて、細胞内に発現している β -ラクタマーゼタグをラベル化した。アミノ酸が欠乏した飢餓状態で細胞を数時間培養しながら観察を行うと、細胞内にプロープ由来の輝点が観測された。この輝点はリソソームマーカーと局在が合致しており、蛋白質がリソソームに移行していることが確認できた。従って、蛋白質がオートファジー誘導時にリソソームに移行し pH が低下する過程をイメージングすることに成功した (Fig.2) (Angew. Chem. Int. Ed. 62, e202301704 (2023))。

本研究で開発した骨細胞機能可視化プロープ、および蛋白質ラベル化プロープは生物個体の細胞機能解析、オルガネラの時空間的な解析のための化学ツールとしてさらに応用できることが期待される。

Fig.2 pH 応答性ラベル化プロープによるオートファジー誘導時の蛋白質のリソソーム移行のイメージング。スケールバーは 20 μ m を表す。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Vicente Manuel, Salgado-Almario Jussep, Collins Michelle M., Martinez-Sielva Antonio, Minoshima Masafumi, Kikuchi Kazuya, Domingo Beatriz, Llopis Juan	4. 巻 9
2. 論文標題 Cardioluminescence in Transgenic Zebrafish Larvae: A Calcium Imaging Tool to Study Drug Effects and Pathological Modeling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 1294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines9101294	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Tsukazaki Hiroyuki, Kikuta Junichi, Ao Tomoka, Morimoto Akito, Fukuda Chie, Tsuda Eisuke, Minoshima Masafumi, Kikuchi Kazuya, Kaito Takashi, Ishii Masaru	4. 巻 152
2. 論文標題 Anti-Siglec-15 antibody suppresses bone resorption by inhibiting osteoclast multinucleation without attenuating bone formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 116095
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2021.116095	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Konishi Yuki, Okunishi Atsuya, Sugihara Fuminori, Nakamura Tatsuya, Akazawa Kazuki, Minoshima Masafumi, Kikuchi Kazuya	4. 巻 94
2. 論文標題 Development of Off-On Switching 19F MRI Probes for Cathepsin K Activity Detection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 1690 ~ 1694
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/bcsj.20210099	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Reja Shahi Imam, Minoshima Masafumi, Hori Yuichiro, Kikuchi Kazuya	4. 巻 12
2. 論文標題 Near-infrared fluorescent probes: a next-generation tool for protein-labeling applications	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 3437 ~ 3447
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0SC04792A	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kowada Toshiyuki, Arai Keisuke, Yoshimura Akimasa, Matsui Toshitaka, Kikuchi Kazuya, Mizukami Shin	4. 巻 60
2. 論文標題 Optical Manipulation of Subcellular Protein Translocation Using a Photoactivatable Covalent Labeling System	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 11378 ~ 11383
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202016684	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hori Yuichiro, Nishiura Miyako, Tao Tomomi, Baba Reisuke, Bull Steven D., Kikuchi Kazuya	4. 巻 12
2. 論文標題 Fluorogenic probes for detecting deacylase and demethylase activity towards post-translationally-modified lysine residues	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 2498 ~ 2503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0SC06551J	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Kazuya Kikuchi
2. 発表標題 Nano-particle based 19F MRI contrast agent with tunable chemical switches
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 澤田 嗣郎、小澤 岳昌、北森 武彦、中村 洋 (東京理科大学名誉教授)、藤浪 真紀、宮村 一夫、石丸 洋一郎、浦野 泰照、加地 範匡、坂 真智子、鈴木 茂、瀬藤 光利、宗林 由樹、馬場 嘉信、船津 公人、本田 暁紀、末永 智一、宮野 博、本山 晃	4. 発行年 2022年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 1072
3. 書名 先端の分析法 第2版 (原理編第3章プローブ, MRIプローブ担当)	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ケージド化合物から化合物を放出させる方法	発明者 袁島維文、橋本龍、菊地和也	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-022014	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	堀 雄一郎 (Hori Yuichiro)		
研究協力者	藪島 維文 (Minoshima Masafumi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------