

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23685039

研究課題名(和文)細胞オルガネラ局在性を有する金属イオン蛍光プローブの開発と一細胞多重染色への応用

研究課題名(英文)Development of organelle-targeting fluorescent probes for metal ion and its application to multi-color imaging

研究代表者

多喜 正泰(Taki, Masayasu)

名古屋大学・その他の研究科・准教授

研究者番号：70378850

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 23,100,000円、(間接経費) 6,930,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内におけるシグナル伝達機構を分子レベルで解明するためには、細胞内におけるシグナル伝達物質の時間的・空間的動態を捉える必要がある。その有用な手法として、細胞内オルガネラに対して特異的に局在化する蛍光プローブを開発し、各種金属イオンの部位特異的な可視化を行った。蛍光プローブにコレステロール基あるいはカチオン性官能基を組み込むことによって、細胞膜およびミトコンドリアにそれぞれプローブ分子を集積することに成功した。さらに、生細胞内における亜鉛および銅一価イオンの局所的蛍光イメージングも達成した。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate intracellular signal transduction pathway at the molecular level, it is necessary to detect the temporal and spatial changes of intracellular signaling molecules. For this purpose, we have developed several metal ion fluorescent probes that can specifically localize cell organelle. Attachment of cholesterol or cationic functional groups to the probe skeletons makes it possible to accumulate the probes in the appropriate sites in the cell. By using these probes, I have succeeded in monitoring the local concentration changes of Zn(II) and Cu(I) in fluorescence.

研究分野：複合化学

科研費の分科・細目：生体関連化学

キーワード：蛍光プローブ 生体金属イオン 細胞小器官 多重染色 局所イメージング

1. 研究開始当初の背景

鉄、亜鉛、銅などに代表される微量遷移金属元素は、生命機能の維持に必須の様々な役割を担っている。トランスポータータンパク質によって細胞内に取り込まれた遷移金属イオンの多くはタンパク質に結合し、酵素活性中心や構造維持因子など、それぞれの金属イオン特有の機能を発揮している。一方、細胞内にはタンパク質や内在性物質と弱く結合し、速度論的に解離可能な「遊離の金属イオンプール」が存在していると言われており、金属イオンの恒常性（ホメオスタシス）の維持や金属代謝に深く関与していると考えられている。しかしながら、このような微量金属の代謝や動態に関わる分子群の同定がさほど進展していないため、その生理的役割や金属イオンのネットワークに関しては細胞レベルにおいてさえ多くの部分が未解明のままである。これを解明するためには、細胞内の各金属濃度変化をより高い時空間解像度でイメージングする、すなわち各細胞内オルガネラ近傍の局所的な金属イオン濃度変化をリアルタイムで検知できる新たな手法や技術の開発が必要である。

2. 研究の目的

本研究ではより効果的な「細胞オルガネラの局所的蛍光イメージング」を実現するためのツール分子として「オルガネラ局在性を有する金属イオン蛍光プローブ」を創製することを目的とし、特定オルガネラに局在化することが知られている分子団を蛍光プローブの誘導基として分子内に予め導入する方法を考案した。この手法により、理論上、細胞内のすべてのオルガネラに対する特異的な金属イオン蛍光プローブの局在化が可能となるのみならず、使用する蛍光団を適宜変更することによって、同一細胞のマルチカラーイメージング（多重染色）が可能となる点である。

3. 研究の方法

(1) 部位局在型亜鉛プローブの合成と機能評価

亜鉛イオンに対する高い選択性を保持したまま親和性を制御するため、様々な亜鉛結合部位を有するプローブを合成し、物理化学的特性および金属イオン選択性を明らかにした。次に細胞膜、あるいはミトコンドリアに局在する誘導基を様々な蛍光分子に結合させ、その局在の様子を観察した。最後に、各蛍光プローブにオルガネラ誘導基を連結し、各オルガネラにおける亜鉛イオンの蛍光イメージングを行った。

(2) 部位局在型銅一価蛍光プローブの合成と機能評価

新規銅一価蛍光プローブの骨格として hydroxymethyl rhodol (HMR) を採用し、その反応性について検討した。これと合わせ、これまで開発してきた還元型フルオレセインを骨格とするプローブ分子に対してもオルガネラ誘導基を連結させ、その反応性を比較すると共に、細胞内銅一価イオンプールの蛍光

イメージングを行った。

4. 研究成果

(1) 部位局在型亜鉛プローブの機能評価およびマルチカラーイメージングへの応用
細胞内の特定オルガネラにおける部位特異的な亜鉛イオンの挙動を検出するため、新規蛍光プローブの合成と機能評価を行った。1つはミトコンドリアへの局在化を指向したローダミン型 (LRos-BAC) であり、もう1つは分子内にコレステロール基による細胞膜局在化を図ったフルオレセイン型 (LF-Chol) の亜鉛蛍光プローブである (図1)。いずれの分子も同じ亜鉛イオン結合部位を有している。

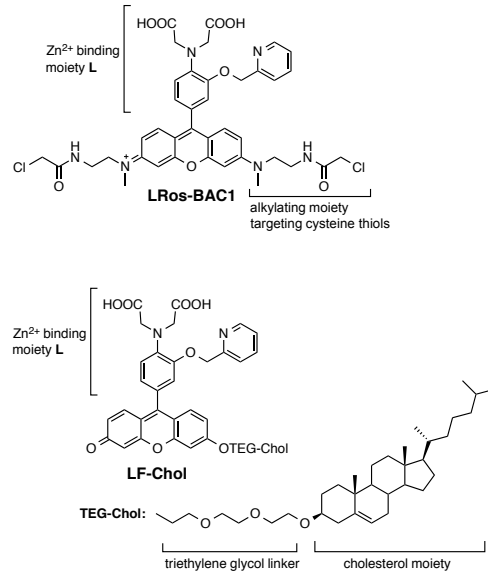


図1. 亜鉛蛍光プローブ LRos-BAC および LF-Chol の構造

亜鉛イオンに対する蛍光応答特性について評価するために、オルガネラ局在性を取り除いた化合物を用いて検証した。いずれのプローブ分子骨格も高い水溶性を有しておりほぼ無蛍光であるが、亜鉛イオンの添加により100倍以上もの蛍光増大を示した。一方で亜鉛錯体の結合解離定数は異なり、フルオレセイン型の場合は30 nM程度であったのに対し、ローダミン型では300 nM程度となり、蛍光団の種類により有効検出濃度が異なることがわかった (図2)。いずれも、蛍光応答は亜鉛イオンに対して特異的であり、他の金属イオンの共存実験から生理的条件下においても亜鉛イオンを高感度に検出できることを確認した。

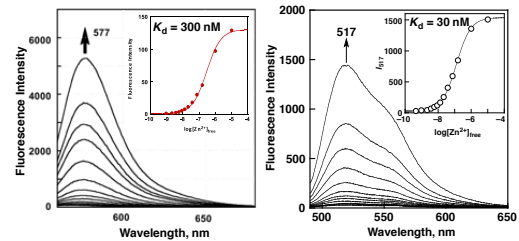


図2. LRos-BAC および LF-Chol の亜鉛イオンに対する蛍光応答。

前述のプロープ分子自身は蛍光 OFF の状態であるため、オルガネラへの局在化を確認するには、常時蛍光が ON となるモデル分子を用いた蛍光イメージング実験を行う必要がある。それぞれの蛍光プロープから亜鉛イオン結合部位を取り除いた蛍光分子を合成し、HeLa 細胞の染色を行った。その結果、コレステロール基を有するフルオレセインは細胞膜から、ローダミン型の分子からはミトコンドリアからの発光がそれぞれ観測された (図 3)。後者の分子はシステインチオールと共有結合可能なクロロアセトアミド基を有している。すなわち、ミトコンドリアに発現しているタンパク質のシステイン残基と共有結合することができ、4 回の洗浄操作によっても細胞外に溶出することなく安定に存在していることがわかった。

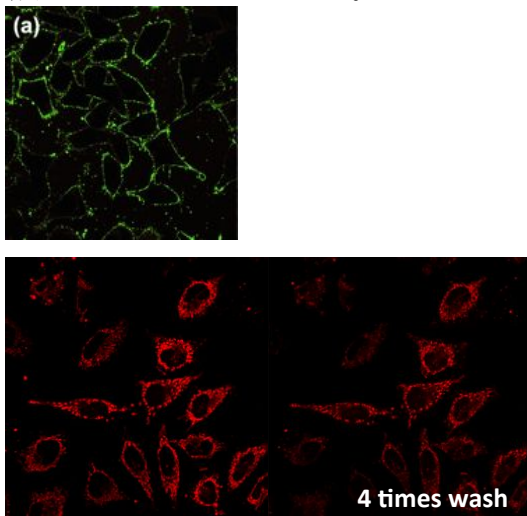


図 3. LF-Chol および LRos-BAC の誘導体を用いた細胞染色。上図：コレステロールによる細胞膜への局在。下図：ミトコンドリアに局在したロサミン色素。共有結合を介したことにより、細胞の洗浄操作による蛍光強度の減少はごくわずかにとどまる。

それぞれの分子を用いて細胞系における亜鉛イオンの検出を行った。その結果、フルオレセイン型のプロープでは細胞膜近傍の、ローダミン型のプロープではミトコンドリア近傍の局所的な亜鉛イオン濃度変化を可視化できることを明らかにした (図 4)。

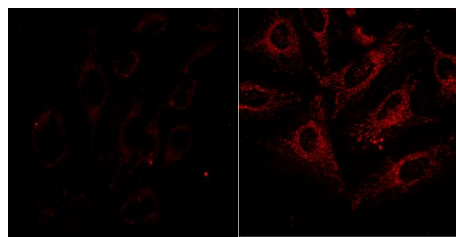
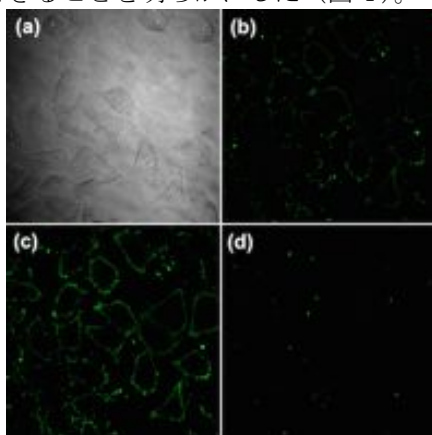


図 4. LF-Chol (上図) および LRos-BAC (下図) を用いた細胞膜およびミトコンドリア近傍における亜鉛濃度変化の蛍光イメージング。

さらに細胞質に分布する亜鉛蛍光プロープ (L2FLH) を新たに合成し、LRos-BAC と共染色することにより、細胞内亜鉛イオンのマルチカラーイメージングを行った。ミトコンドリア膜電位の脱分極剤である CCCP を添加したところ、LRos-BAC の蛍光強度はほとんど変化しなかったのに対し、L2FLH は有意な蛍光強度の増大が確認された (図 5)。本結果は、CCCP の添加によりミトコンドリアから細胞質への亜鉛イオンの流出が起こったためであると考えられるが、LRos-BAC 由来の蛍光強度が下がらなかったのは、この濃度変化が本プロープの適用濃度範囲外であった可能性がある。

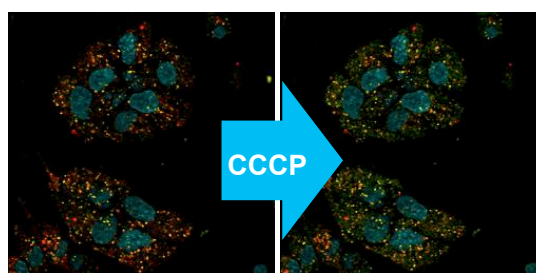


図 5. 異なる 2 つの亜鉛蛍光プロープを用いた細胞内亜鉛イオンのマルチカラーイメージング。赤：LRos-BAC, 緑：L2FLH, シアン：Hoechst 33342

そこでさらに新たなミトコンドリア亜鉛蛍光プロープとして L2Ros-BAC を合成した。本プロープ分子も同様、ミトコンドリア亜鉛イオン濃度変化を可視化できることがわかり、マルチカラーイメージングへと展開している段階である。

(2) ミトコンドリア局在型銅プロープの機能評価

HMR 蛍光色素のフェノール水酸基をアルキル化するとスピロ環を形成し無蛍光物質になることが知られている。そこで、HMR の酸素原子に銅イオン反応部位である TPA 配位子を、窒素原子にミトコンドリア局在性を有するトリフェニルホスホニウム (TPP) 部位を導入した新規銅一価蛍光プロープ (RdITPA-TPP) を合成した (図 6)。グルタチオン存在下で銅イオンを添加したところ、100 倍以上もの蛍光増大が認められ、銅一価プロープとして機能することを確認した。

同様の蛍光増大は細胞内ミトコンドリアにおいても認められ、ミトコンドリアに存在する銅イオンのイメージングに成功した（図7）。

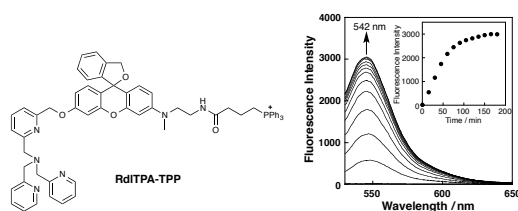


図6. ミトコンドリア局在型銅プローブ RdlTPA-TPP の構造

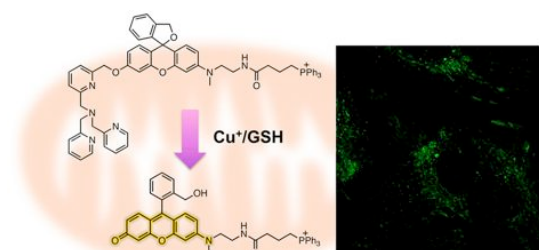


図7. ミトコンドリア内銅一価イオンの検出

この結果についてさらに詳細な検討を行った。銅イオンを含まない培地で培養した HeLa 細胞に対して RdlTPA-TPP を加えたところ、細胞内部から点状の蛍光が観測された。共染色実験の結果から、この蛍光は酸性オルガネラと一致していることがわかり、プローブのごく一部が酸性領域に局在し開環していることが明らかとなった。続いて銅イオンを含む培地で培養した細胞を用いて検討したところ、ミトコンドリアからの非常に強い蛍光が観測され、局所的な細胞内銅イオンの検出に成功した。一方、先に示した酸性オルガネラからの蛍光強度については変化が認められなかったことから、リソソームなどには銅一価イオンプールが存在しないことが明らかとなった（図8）。

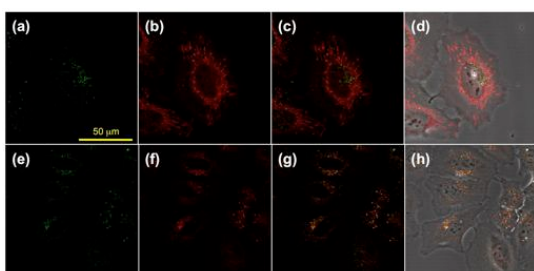


図8. RdlTPA-TPP の細胞内局在。(a)-(d): ミトコンドリア染色剤、(e)-(h): リソソーム染色剤との共染色結果。リソソーム染色剤とよい一致を示したことから、プローブの一部は細胞内酸性領域において開環した状態で存在していることがわかる。

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5件）

M. Taki, F. Asahi, T. Hirayama, Y. Yamamoto
Design and Synthesis of Fluorescent Probe for Polyhistidine Tag Using Macrocyclic Nickel(II) Complex and Fluorescein Conjugate
Bull. Chem. Soc. Jpn. **84**, 386–394 (2011)

S. Iyoshi, M. Taki, Y. Yamamoto
Development of a Cholesterol-Conjugated Fluorescent Sensor for Site-Specific Detection of Zinc Ion at the Plasma Membrane
Org. Lett. **13**, 4558–4561 (2011)

T. Hirayama, M. Taki, K. Akaoka, Y. Yamamoto
Development of a dual functional luminescent sensor for zinc ion based on a peptidic architecture
Bioorg. Med. Chem. Lett. **22**, 7410–7413 (2012).

M. Taki, K. Akaoka, S. Iyoshi, Y. Yamamoto
Rosamine-Based Fluorescent Sensor with Femtomolar Affinity for the Reversible Detection of a Mercury Ion
Inorg. Chem. **51**, 13075–13077 (2012).

M. Taki, K. Akaoka, K. Mitsui, Y. Yamamoto
Mitochondria-targeted Turn-on Fluorescent Probe Based on a Rhodol Platform for the Detection of Copper(I)
Org. Biomol. Chem., **12** (27), 4999–5005 (2014)

〔学会発表〕（計17件）

多喜正泰・伊吉祥平・山本行男
様々なチオエーテル配位子を有する銅一価錯体の構造と機能
第61回錯体化学討論会
岡山理科大学, 2011年9月17日

赤岡一志・伊吉祥平・多喜正泰・山本行男
光誘起電子移動機構を利用した時間分解型亜鉛蛍光センサーの開発
第61回錯体化学討論会
岡山理科大学, 2011年9月17日

三井浩司・多喜正泰・山本行男
還元型フルオレセイン骨格を有する銅一価蛍光プローブの細胞内オルガネラ局在性の評価
日本化学会第92春季年会
慶應義塾大学, 2012年3月25–28日

赤岡一志・多喜正泰・山本行男
光励起電子移動機構を利用した時間分解型亜鉛蛍光センサーの開発
日本化学会第92春季年会
慶應義塾大学, 2012年3月25–28日

赤岡一志・山崎碧・多喜正泰・山本行男
細胞膜透過性を有する時間分解型亜鉛蛍光センサーの開発

日本化学会第 92 春季年会
慶應義塾大学, 2012 年 3 月 25-28 日

押田至雅・多喜正泰・山本行男
ロサミン型亜鉛蛍光プローブによるミトコンドリアタンパク質の共有結合的ラベル化
日本化学会第 92 春季年会
慶應義塾大学, 2012 年 3 月 25-28 日

押田至雅・多喜正泰・山本行男
細胞内オルガネラ局在型亜鉛蛍光プローブの開発
錯体化学会第 62 回討論会
富山大学, 2012 年 9 月 21-23 日

Kazushi Akaoka, Midori Yamasaki, Masayasu Taki, and Yukio Yamamoto
Development of Highly Sensitive Time-Resolved Luminescence Sensors for Zinc Ion
The Second Asian Chemical Biology Conference
Itoman, Okinawa, July 4-6, 2012

Masayasu Taki, Shohei Iyoshi, and Yukio Yamamoto
Fluorescent Sensors Based on Copper- induced C-O Bond Cleavage and Its Application to Intracellular Imaging
The 6th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference
Hong Kong Polytechnic University, Nov 5-8, 2012

押田至雅・多喜正泰・山本行男
種々のオルガネラ局在型亜鉛蛍光プローブを用いた細胞のマルチカラーイメージング
日本化学会第 93 春季年会
立命館大学びわこ・くさつキャンパス, 2013 年 3 月 22-25 日

三井浩司・多喜正泰・山本行男
スピロ開環反応を利用した銅一価イオン蛍光センサーの開発
日本化学会第 93 春季年会
立命館大学びわこ・くさつキャンパス, 2013 年 3 月 22-25 日

Masayasu Taki, Kazushi Akaoka, and Yukio Yamamoto
Mitochondria-targeted Turn-on Fluorescent Probe for Copper(I) Based on a Rhodol Platform
International Conference on BioInorganic Chemistry 16
Grenoble, France, July 22-26, 2013

ユーロピウムイオンを発光中心とする時間分解型亜鉛蛍光センサー
赤岡一志・多喜正泰・山本行男
第 30 回希土類討論会
北九州市, 2013 年 5 月 23-24 日

赤岡一志・多喜正泰・山本行男
細胞内亜鉛イオンの時間分解イメージング
錯体化学会第 63 回討論会
琉球大学千原キャンパス, 2013 年 11 月 2-4 日

Lanthanide Complexes for Time-resolved Luminescence Imaging of Metals in Living Cells
Masayasu Taki
錯体化学会第 63 回討論会
琉球大学千原キャンパス, 2013 年 11 月 2-4 日

赤岡一志・多喜正泰・山本行男
ロドール骨格を基盤とするミトコンドリア局在型銅一価蛍光プローブの開発
日本化学会第 94 春季年会
名古屋大学, 2014 年 3 月 27-30 日

浅井悠志・多喜正泰・赤岡一志・山本行男
ミトコンドリア標識能を有する亜鉛蛍光プローブの開発
日本化学会第 94 春季年会
名古屋大学, 2014 年 3 月 27-30 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

多喜 正泰 (TAKI MASAYASU)
名古屋大学・トランスフォーマティブ生命分子研究所・准教授
研究者番号: 70378850