

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：32702

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510316

研究課題名(和文)新規蛍光プローブを利用した細胞機能解析

研究課題名(英文)Studies on the cell function with a novel fluorescent probes.

研究代表者

川添 嘉徳 (Kawazoe, Yoshinori)

神奈川大学・付置研究所・研究員

研究者番号：20402927

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究においては、受給者が見出した新規蛍光プローブの誘導展開を通じた特性の変化と、それら化合物を利用した細胞小器官の特性解明を目指した。種々の誘導体を合成し、その特性を精査したところ、蛍光を発するpHやその色調を変化させる事に成功し、またそのうちの一つは微絨毛を染色するという、新しい特性を発揮した。

研究成果の概要(英文)：The aims of this study are changing the property of the fluorescent reagent I found through making derivatives and elucidation of cellular function with the compounds. I prepared several derivatives and succeeded to change their activated pH or fluorescent color. And I found one of them showed novel feature, staining the microvilli.

研究分野：生物分子科学

キーワード：分子イメージング 蛍光化合物 分子プローブ オルガネラ

様式 F-19

1. 研究開始当初の背景

現在までも生細胞に適応しうる蛍光イメージング試薬が開発・市販されている。そのような蛍光プローブの対象は、各種オルガネラや細胞骨格系、核酸、糖鎖といった生体成分の可視化を初めとして、カルシウムのような金属イオン、活性酸素種やセカンドメッセンジャーの指示薬といった具合に多岐に渡る。これらは主として生命科学や医学の分野で利用され、生命現象の解明に貢献している。しかしながら、未だに適用の範囲外にある生体成分も少なくない。従って新規な蛍光プローブの開発が望まれていた。

そのような状況において受給者は、生細胞に適用しうるオルガネラ用新規蛍光プローブの開発を目指し、細胞内で構造変換を受けて蛍光波長が長波長側へとシフトすると同時に蛍光強度が増大し、ミトコンドリア表面

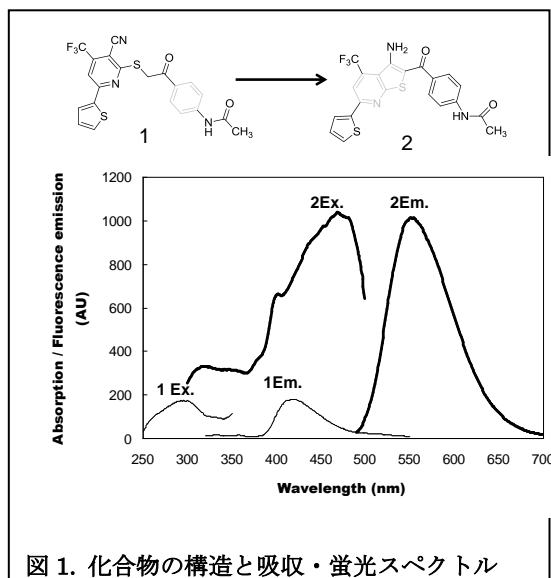


図 1. 化合物の構造と吸収・蛍光スペクトル

を染色する化合物を見出した (図 1)。

そこで本研究では、化合物 1 とその機能を拡張した誘導体を作成し、それらを道具として用いる事によって細胞機能の解析を行う事とした。

2. 研究の目的

- (1) 受給者が見出した蛍光プローブを用いて本蛍光プローブを誘導展開することによる応用性の拡張
- (2) 本蛍光プローブを用いた細胞内小器官相互作用の解析を行う事を目的とする。具体的には、1. 見出した化合物の構造変換は、pH が大きく影響

を及ぼしている事が明らかとなった。そこで化合物の官能基を置き換える事によって、pH 依存性や色調を変えることを目指す。このことによって、二重染色等の用途の拡充が図れる。さらに、このように改変した蛍光プローブを用いて、リンパ球、特に好酸球の簡便な同定と単離に利用できると考えられる。2. 近年の研究によれば、細胞内小器官、オルガネラは各々独立した器官ではなく、互いに物理的な結合をしている事が明らかとなってきた。そこで本研究では、ミトコンドリア膜を染色する本化合物を利用する事で、このような物理的結合、特にミトコンドリアと ER との連結 (ERMES: ER-mitochondria encounter structure) の成り立ちを視覚的に明らかに出来るかもしれない。

多くの蛍光プローブは消光状態でもバックグラウンドレベルの蛍光を持つ事は避けられず、S/N 比に問題が有る場合が多い。本研究で扱う蛍光プローブは、構造変換をしない限り無蛍光であるため、高い S/N 比が期待出来る。

3. 研究の方法

pH 依存性、及び蛍光波長の異なる誘導体の作成については、構造変化に必要な α -プロトンの酸性度、及び蛍光中心となる基本骨格の電子密度を変化させるような構造展開を行う。作出した誘導体を用いたリンパ球の単離には、分化誘導可能な細胞株によるリンパ球の同定実験を経て、末梢血からのワンステップ単離を目標とする。

また、本化合物はミトコンドリアの表面を染色するので、蛍光顕微鏡、特に共焦点装置を内蔵した顕微鏡を用いて観察する。

4. 研究成果

- (1) 本蛍光プローブを誘導展開することによる応用性の拡張

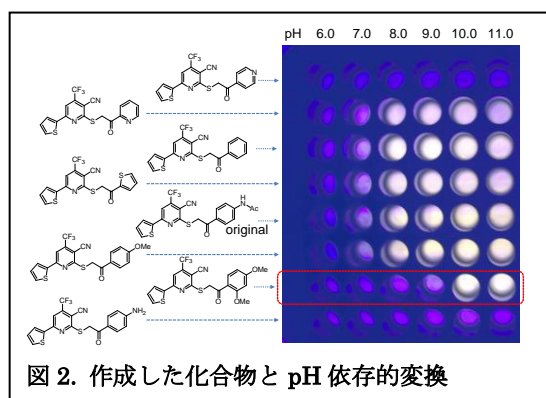


図 2. 作成した化合物と pH 依存的変換

化合物 1 から化合物 2 への環化反応は、リンカー部位の α -プロトンが脱離してエノール中間体を形成する事で開始されえると考えられる。そこで化合物 1 の灰色で示した部位(図 1)のベンゼン間のアセチルアミンを、それよりも電子吸引性/電子供与性の官能基で置換することで α -プロトンの脱離性を調節できると考えた。このアイデアに基づきいくつかの誘導体を合成したところ、図 2 のように構造変換が起こる pH を変化させる事に成功した。

また、実際には化合物 2 が蛍光を持つわけであるが、その蛍光中心は構造式の灰色で示した部分であると考えられる(図 1)。従って、そこに直結する官能基を置換する事で蛍光中心の電子密度を変化させれば、蛍光の色調が変化すると考えられる。この考えに基づき種々の誘導体を作成したところ、上部のトリフルオロ基をメチル基、チオフェン基をナフチル基に置換することで蛍光を黄色から緑色へと変化させる事が出来た(図 3)。

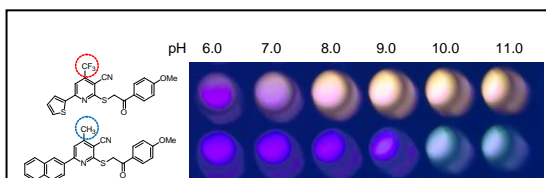


図 3. 誘導展開による色調の変化

続いて作成した誘導体を用いて、リンパ球の同定実験を行った。ヒト好酸球白血病株である EoL-1 は白血病由来の幼若好酸球であり、ブチル酸処理によって成熟好酸球へと分化する。そこで、分化前後で pH 依存性を変化させたプローブを用いて細胞染色を行ったところ、分化後において染色される細胞内顆粒が増加していた(図 4)。従って、本プロ

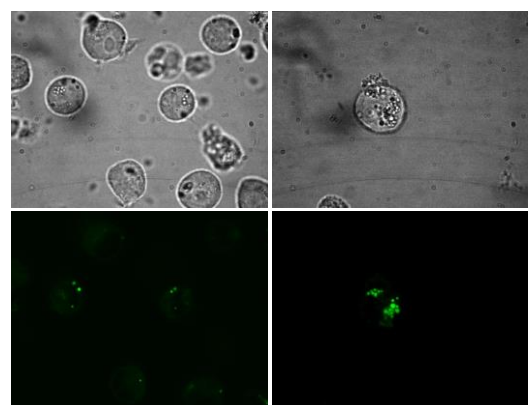


図 4. pH10 応答化合物による EoL-1 染色像 細胞内顆粒が本プローブによって染色される。分化前(左)に比較して、分化後(右)は染色される顆粒が増加している。

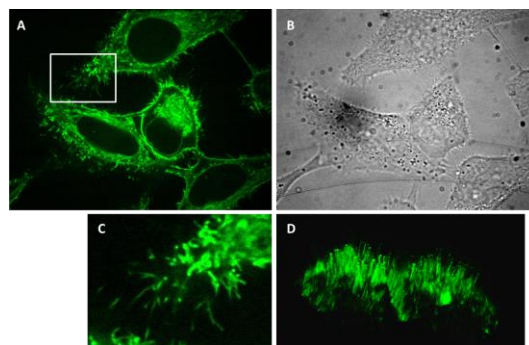


図 5. 化合物 2 の細胞染色像 A) HeLa 細胞を化合物 2 で処理し、生きたまま共焦点レーザー顕微鏡にて画像を取得した。B) A の明視野像 C) A の白枠内を拡大。突起状の微絨毛が染色されている。細胞膜は観察されない。D) 化合物 2 で染色した細胞を共焦点レーザー顕微鏡で z 軸方向に光学的連続切片像を取得した。それらを 3D 画像に再構築し、斜め上方から見たもの(左右に二個の細胞が存在する)。多くの微絨毛が確認できる。

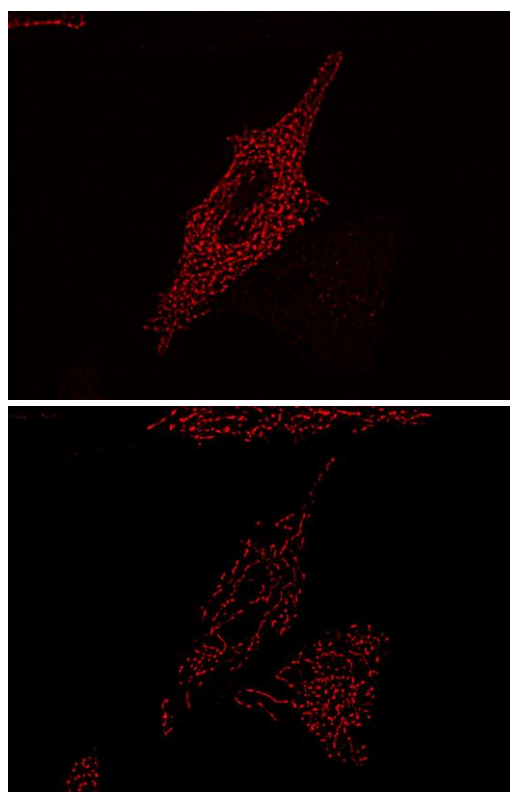


図 6. 作出した細胞株 ER (上) 及びミトコンドリア (下) を赤色蛍光タンパク質で恒常的に標識した細胞の蛍光画像。

ープは好酸球の同定に有効であると考えられた。

さらに、今回作成した誘導体 30 余个すべてについてその細胞染色性を調べたところ、そのうちのひとつについて、オリジナルのミトコンドリアではなく、細胞表面の微絨毛を染色する事が明らかとなった(図 5)。これまでに微絨毛を染色するような蛍光プローブは知られておらず、細胞機能の解明に貢献すると期待される。

(2) 本蛍光プローブを用いた細胞内小器官相互作用の解析

これまで細胞内小器官は、各々独立した器官であると考えられてきたが、近年の研究に拠れば物理的に相互作用している事が明らかになってきた。例えば核膜と ER の膜は物理的に連結している。そのような物理的相互作用の中でも特に、ミトコンドリアと ER との接点は **ERMES** と名付けられ、その機能に注目が集まっている。そこでミトコンドリア膜を染色する化合物 **1** を利用して、その成立過程を可視化する事を試みた。そのためにまず、ミトコンドリア、あるいは ER が恒常的に赤い蛍光を発している細胞株を作成した(図 6) この細胞株を化合物 **1** で染色し、共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。しかし時間経過を追う等の条件検討を行ったが、**ERMES** の同定にまでいたらなかった。この理由としては、取得画像の解像度の質や **ERMES** 出現の頻度等が考えられる。今後は、ES 細胞のような増殖が速い細胞の利用、細胞周期を同調させた細胞の利用、を検討する事によって **ERMES** 形成の頻度を高め、より解像度の高い画像を取得する事で目的を達成していきたい。

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 9 件)

(1) Klionsy, D. J. and 1269 others, Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy, *Autophagy*, 査読有, 8, 2012, 445-544

(2) Takemoto, N., Suehara, T., Frisco, H. L., Sato, S., Sezaki, T., Kusamori, K., Kawazoe, Y., Park, S. M., Yamazoe, S., Mizuhata, Y., Inoue, R., Miller, G. J., Hansen, S. U., Jayson, G. C., Gardiner, J. M., Kanaya, T., Tokitoh, N., Takakura, Y., Kioka, N., Nishikawa, M., and Uesugi, M., Small molecule-induced clustering of heparin sulfate promotes cell adhesion., *J. Am.*

Chem. Soc., 査読有, 135, 2013, 11032-11039

(3) Kawazoe, Y., Uemura, D., Chemotherapy for cancer stem cells, *OncoDrugs*, 査読有, 1, 2013, 35

(4) Maru, N., Chikaraishi, N., Yokota, K., Kawazoe, Y., and Uemura, D., Jolkinolide F, Jolkinolide F, a cytotoxic diterpenoid from *Euphorbia jolkinii*, *Chem. Lett.*, 査読有, 42, 2013, 756-757.

(5) 川添嘉徳, 上村大輔 エリブリン (ハルヴェン): 海洋天然物からの創薬展開、細胞工学、査読無し、32, 2013, 675-681.

(6) Hirata, N., Nakagawa, M., Fujibayashi, Y., Yamauchi, K., Murata, A., Minami, I., Tomioka, M., Kondo, T., Kuo, T. F., Endo, H., Inoue, H., Sato, S., Ando, S., Kawazoe, Y., Aiba, K., Nagata, K., Kawase, E., Chang, Y. T., Suemori, H., Eto, K., Nakauchi, H., Yamanaka, S., Nakatsuji, N., Ueda, K., and Uesugi, M., A chemical probe that labels human pluripotent stem cells., *Cell Rep.*, 査読有, 6, 2014, 1165-1174.

(7) Kawazoe, Y., Tanaka, Y., Omura, S., and Uemura, D., Design, synthesis, and evaluation, derivatives of the fat-accumulation inhibitor ternatin: toward ternatin molecular probes., *Tetrahedron Lett.*, 査読有, 55, 2014, 4445-4447

(8) Hanif, N., Yamada, K., Kitamura, M., Kawazoe, Y., Uemura, D., New indole alkaloids from the sponge *Plakortis* sp., *Chem. Natl. Comp.*, 査読有, in press

(9) Inuzuka, T., Yamamoto, K., Iwasaki, A., Ohno, O., Suenaga, K., Kawazoe, Y., and Uemura, D., An inhibitor of the adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells, yoshinone A, and its analogues, isolated from the marine cyanobacterium *Leptolyngbya* sp., *Tetrahedron Lett.*, 査読有, 55, 2014, 6711-6714.

[学会発表] (計 17 件)

(1) 川添嘉徳 小分子化合物による細胞機能解析、平成 24 年度第一回舎密会、神奈川大学、2012 年 7 月、神奈川県平塚市

(2) 田中陽子、増田駿、川添嘉徳、上村大輔、脂肪蓄積阻害物質テルナチンのケミカルバ

イオロジー研究、一日本化学会秋季事業—
第2回CSJ化学フェスタ 2012年10月 東京

(3) 山本啓太、丸範人、川添嘉徳、上村大輔、
クロイソカイメン由来の微量生物活性物質、
日本化学会第93春期年会 2013年3月 滋
賀県大津市

(4) 横田圭祐、川添嘉徳、上村大輔、渦鞭毛
藻の大量培養とシンビオイミンの生理活性、
日本化学会第93春期年会 2013年3月 滋
賀県大津市

(5) 田中陽子、片桐圭祐、齊藤直紀、川添嘉
徳、上村大輔、脂肪蓄積阻害物質テルナチ
ンのケミカルバイオロジー、日本化学会第
93春期年会 2013年3月 滋賀県大津市

(6) Kawazoe, Y., Tanaka, Y., Uemuara, D.,
Chemical Biology of a cyclic peptide
exhibiting fat accumulation inhibition,,
International Symposium on Natural
Products Chemistry and Chemical
Biology 2013 November, 2013, Nagoya

(7) Kawazoe, Y., Uemura, D.,
Chemotherapy for cancer stem cells.,
Anticancer Drugs 2013, August, 2013,
Stockholm, Sweden

(8) 川添嘉徳、田中陽子、上村大輔、脂肪
蓄積阻害活性を示す天然物テルナチンの作
用機構、文部科学省新学術領域研究・がん
支援「化学療法基盤支援活動」第3回シン
ポジウム、2014年5月、沖縄県喜瀬

(9) 山本啓太、大島貴則、川添嘉徳、上村
大輔、タンパク質リン酸化酵素 GSK-3 β の
阻害活性を有する渦鞭毛藻由来天然物探索、
日本化学会第94春季年会、2014年3月、
名古屋

(10) 田中陽子、片山知昭、川添嘉徳、上村
大輔、脂肪蓄積阻害活性物質テルナチンの
ケミカルバイオロジー、日本化学会第94
春季年会、2014年3月、名古屋

(11) 山本啓太、丸範人、川添嘉徳、上村大
輔、脂肪細胞分化阻害を示す海洋天然物、
日本化学会第94春季年会、2014年3月、
名古屋

(12) 鈴木佑太郎、穴澤雄太、阿部孝宏、川
添嘉徳、渡部多恵子、山田薫、上村大輔、
Halichrome A の合成研究、日本化学会第
94春季年会、2014年3月、名古屋

(13) 川添嘉徳、田中陽子、山本啓太、岩崎
有紘、大野修、大村幸和、末永聖武、上村
大輔、脂質代謝を調節する天然有機化合物
群、第56回天然有機化合物討論会、2014
年10月、高知

(14) 鈴木佑太郎、阿部孝宏、川添嘉徳、渡
部多恵子、山田薫、上村大輔、Halichrome
A の合成研究、日本化学会第95回春季年
会、2015年3月、千葉県船橋市

(15) 鈴木智也、矢部丈登、川添嘉徳、上村
大輔、タンパク質リン酸化酵素 GSK-3b の
阻害活性を有する渦鞭毛藻由来天然物探索、
日本化学会第95回春季年会、2015年3月、
千葉県船橋市

(16) 小林里美、川添嘉徳、上村大輔、海洋
生物由来の生物活性物質探索、日本化学会
第95回春季年会、2015年3月、千葉県船
橋市

(17) 川添嘉徳、岩崎有紘、大野修、末永聖
武、上村大輔、脂質代謝を制御する天然物
yoshinone A、日本化学会第95回春季年会、
2015年3月、千葉県船橋市

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計5件)

名称：N-置換スルフォニルインドール誘導体
化合物の新規用途

発明者：上村大輔、阿部孝宏、川添嘉徳、渡
部多恵子、鈴木佑太郎、山田薫

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2014-042178

出願年月日：2014.03.04

国内外の別：国内

名称：N-スルフォニルインドール誘導体化
合物およびその用途

発明者：上村大輔、阿部孝宏、川添嘉徳、渡
部多恵子、鈴木佑太郎、山田薫

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2014-042177

出願年月日：2014.03.04

国内外の別：国内

名称：抗肥満薬

発明者：上村大輔、川添嘉徳、丸範人、山本
啓太

権利者：同上

種類：特許
番号：特願 2014-137892
出願年月日：2014.07.03
国内外の別：国内

名称：抗肥満剤
発明者：上村大輔、川添嘉徳、小山智之、末永聖武、岩崎有紘
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2015-002278
出願年月日：2015.01.08
国内外の別：国内

名称：N-スルフォニルインドール誘導体化合物およびその用途
発明者：上村大輔、阿部孝宏、川添嘉徳、渡部多恵子、鈴木祐太郎、山田薫
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2015-042828
出願年月日：2015.03.04
国内外の別：国内

○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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川添 嘉徳 (KAWAZOE YOSHINORI)
神奈川大学・天然医薬リード探索研究所・
研究員
研究者番号：20402927