

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K22536

研究課題名（和文）マグネシウムイオン動態のオルガネラ選択的可視化を可能にする新規蛍光プローブの開発

研究課題名（英文）Development of a fluorescent probe which enables organelle-selective imaging of intracellular behaviors of magnesium ion

研究代表者

坂間 亮浩（Sakama, Akihiro）

慶應義塾大学・理工学部（矢上）・研究員

研究者番号：40878170

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：細胞内におけるオルガネラ選択的なマグネシウムイオン（Mg<sup>2+</sup>）動態や、マルチカラーイメージングによるMg<sup>2+</sup>関連シグナルとの相関性を可視化することを目的とし、タグタンパク質である HaloTag に特異的に結合するリガンドを有する新規近赤外 Mg<sup>2+</sup> プローブを開発した。このプローブは HaloTag の形成の有無に関わらず、ミトコンドリアなどの細胞小器官に局在化した。この現象は同プローブの疎水性の高さが原因であると考えられるため、より親水性の高いリガンドを採用したプローブ2種を合成した。これらのプローブは Mg<sup>2+</sup> 応答性には乏しかったが、低親和性カルシウムイオンプローブとして応用できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HaloTag タンパク質リガンドを有する非対称 Si-ローダミン型マグネシウム（Mg<sup>2+</sup>）プローブの合成法を確立したことにより、細胞内 Mg<sup>2+</sup> と関連シグナルのマルチカラーイメージング技術の確立やその技術を用いた新たな生命現象の発見に向けた研究、および他のタグタンパク質リガンドを導入した Si-ローダミン型プローブの開発に貢献することが期待される。また、併せて開発した低親和性カルシウムイオンプローブは、従来の高親和性プローブでは可視化できなかった生命現象の発見やメカニズム解明に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：A novel near-infrared magnesium ion (Mg<sup>2+</sup>) probe with HaloTag ligand to visualize organelle-selective Mg<sup>2+</sup> dynamics in cells and its correlation with Mg<sup>2+</sup>-related signals by multicolor imaging. The probe localized to mitochondria and other organelles with or without HaloTag formation. Since this phenomenon was presumably due to the high hydrophobicity of the probe, two probes employing more hydrophilic ligands were synthesized. Although these probes were hardly Mg<sup>2+</sup>-responsive, it was suggested that they can be applied as low-affinity calcium ion probes.

研究分野：有機合成化学

キーワード：機能性蛍光プローブ 細胞イメージング マグネシウムイオン

## 1. 研究開始当初の背景

マグネシウムイオン ( $Mg^{2+}$ ) は細胞内で最も多く存在する 2 価のイオンであり、細胞内において 300 種類以上の酵素の活性、イオンチャネルに影響を与えるなど様々な重要な役割を担っている (*Arch. Biochem. Biophys.* **2011**, *512*, 1–23)。また、近年セカンドメッセンジャーとして機能していると報告され注目を集めている (*Nature* **2011**, *475*, 471–476)。細胞内  $Mg^{2+}$  濃度は、通常 0.5–1 mM の間で制御されているが、この恒常性の異常は高血圧、糖尿病、パーキンソン病などの疾患を誘発する。しかし、その詳しいメカニズムは解明されていない (*Physiol. Rev.* **2015**, *95*, 1–46)。同じ 2 価のイオンでありながら、カルシウムイオン ( $Ca^{2+}$ ) 動態に関する研究は大きな発展を遂げている。2008 年にノーベル化学賞を受賞している Tsien によって報告された  $Ca^{2+}$  蛍光プローブである Quin2 に続いて様々な  $Ca^{2+}$  蛍光プローブが開発されたためである。 $Mg^{2+}$  の細胞内動態を明らかにするために新たな  $Mg^{2+}$  蛍光プローブの開発が望まれている。所属研究室では、市販される  $Mg^{2+}$  蛍光プローブよりも約 400 倍  $Mg^{2+}$  に対して選択的な応答を示す KMG シリーズを開発してきた。可視から近赤外までの様々な蛍光色素骨格の KMG シリーズが開発されており、 $Mg^{2+}$  関連シグナルとのマルチカラーイメージングを達成している (*Anal. Chem.* **2020**, *92*, 966–974)。しかしながら、細胞内オルガネラ局在性は、色素骨格の特性に依存し、かつ、長時間の分析をしていると特定のオルガネラからプローブが漏れ出てしまうといった問題があった。そのため、オルガネラレベルで時空間的に  $Mg^{2+}$  の長時間イメージングは達成できておらず、数時間におよぶ細胞イベントでの  $Mg^{2+}$  動態の可視化技術が求められている。

## 2. 研究の目的

オルガネラ選択的な局在性を有する新規  $Mg^{2+}$  蛍光プローブを開発することで、これまで見ることができなかった細胞内イベントにおける  $Mg^{2+}$  動態をオルガネラ選択的に可視化できるのか、について検証する。そのために、KMG シリーズにタグタンパク質である HaloTag に共有結合可能なリガンドを導入した新規蛍光プローブ KMG-500Halo を開発し、細胞イベントにおけるオルガネラ局在的な  $Mg^{2+}$  動態の可視化を行う (図 1)。この際、マルチカラーイメージングにより  $Mg^{2+}$  関連シグナルとの相関性も可視化する。

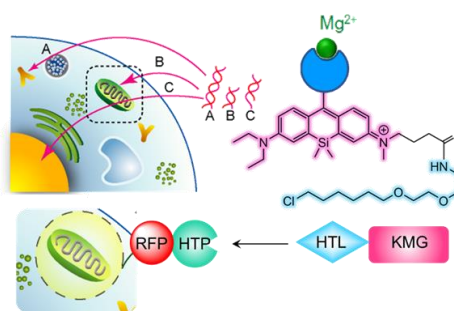


図 1 HaloTag テクノロジーによるオルガネラ選択的ラベル化

## 3. 研究の方法

それぞれ窒素原子に異なる保護基を装着したブロモアニリンから非対称なジアリールシランを合成する。このジアリールシランの片方の窒素原子にカルボン酸ユニットをリンカーとして HaloTag リガンドを導入する。最後に  $Mg^{2+}$  認識部位であるキノリジンユニットとのカップリングを行うことで、HaloTag リガンドを有する KMG-500Halo を得る (図 2)。

合成した KMG-500Halo について、吸収・蛍光スペクトル測定および  $Mg^{2+}$  濃度に応答した蛍光強度の OFF-ON 制御が起ることを確認し、所属研究室にて以前に開発された KMG-500 シリーズと同様の光学特性や  $Mg^{2+}$  応答性を持つことを確認する。細胞質に HaloTag タンパク質を形成させた HeLa 細胞を KMG-500Halo にて染色し、同プローブが HaloTag を形成した部位に局在することを確認する。

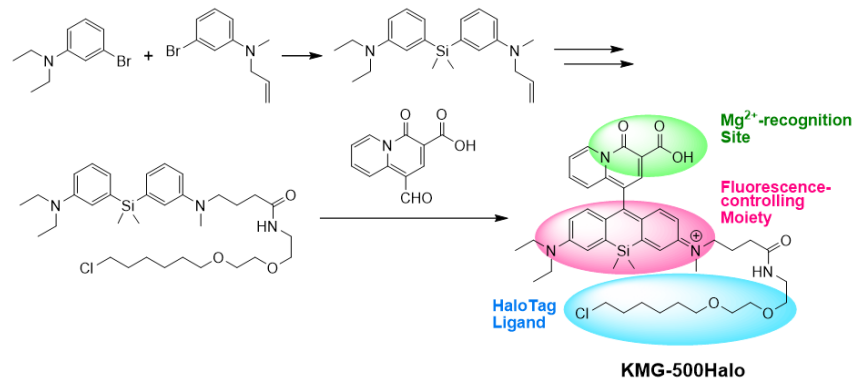


図2 KMG-500Halo の合成スキーム

定量的な  $Mg^{2+}$  イメージングを可能とするため、赤色蛍光タンパク質 RFP と HaloTag タンパク質を接続することでレシオメトリックイメージング型の蛍光プローブとする (図3)。遺伝子発現させた RFP-HaloTag に KMG-500Halo が結合し、RFP から KMG-500Halo への FRET 型レシオメトリックプローブとなる。開発したレシオメトリックプローブのオルガネラレベルでの  $Mg^{2+}$  動態イメージングへの応用として、細胞分裂の際の  $Mg^{2+}$  濃度上昇をイメージングする。細胞分裂の際に DNA は凝縮することが知られており、DNA の負電荷が互いに反発することを抑制するために、細胞内  $Mg^{2+}$  濃度が上昇することが知られている。この際、ATP に結合していた  $Mg^{2+}$  が ATP の消費により放出されるため、細胞内 ATP 濃度は減少する。KMG-500Halo と ATP 蛍光プローブの ATeam (水色および黄色蛍光タンパク質からなる FRET バイオセンサー) との併用により、細胞内  $Mg^{2+}$  と ATP 動態を同時イメージングする。

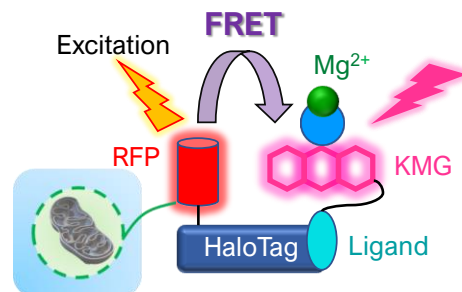


図3 KMG-500Halo と RFP-HaloTag による  $Mg^{2+}$  レシオメトリック蛍光イメージング

#### 4. 研究成果

HaloTag リガンドを導入した非対称ジアリールシランを合成し、 $Mg^{2+}$  認識部位であるキノリジン部位を導入することで目的の Si-ローダミン型プローブ KMG-500Halo を得た。このプローブについて、所属研究室にて以前に開発された KMG-500 シリーズと同様に近赤外域に吸収・蛍光波長を持つとともに、 $Mg^{2+}$  濃度に応答した蛍光の OFF-ON 制御が起こることを確認した。細胞質に HaloTag と赤色蛍光タンパク質を形成させた HeLa 細胞を KMG-500Halo にて染色したところ、同プローブは HaloTag の形成の有無に関わらず、ミトコンドリア等のオルガネラに局在化した (図4)。この現象はプローブの疎水性の高さが原因であると考察した。また、キノリジンリガンドでは細胞内の遊離  $Mg^{2+}$  と  $MgATP$  等の複合体との判別が困難であるとされるため (*Inorg. Chem.* **2014**, *53*, 3204–3209)、低疎水性かつ遊離イオン選択的なりガンド APDAP (*Dalton Trans.* **2018**, *47*, 1879–1887) を採用したローダミン型プローブ APDAP-rhod および APDAP-SiR の開発に取り組んだ (図5)。APDAP をリガンドとし

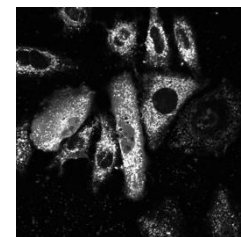


図4 KMG-500Halo で染色した HeLa 細胞

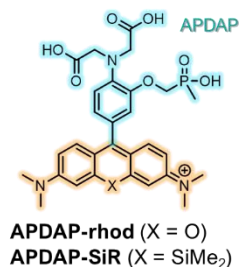


図5 開発した APDAP プローブの構造

て採用した蛍光プローブは報告されているものの、細胞イメージングに応用可能なものはこれまでに開発されていなかった。

APDAP-rhod および APDAP-SiR は予想に反し、細胞内濃度範囲において  $Mg^{2+}$  応答性に乏しかったが、 $Ca^{2+}$  に対しては Turn-ON 型の蛍光応答を示し、 $Ca^{2+}$  との解離定数がそれぞれ 1.1、0.45 mM であった。これら APDAP プローブをアセトキシメチル化して膜透過性を向上させた化合物を用いて HeLa 細胞を染色したところ、ミトコンドリアへの局在が確認された。この細胞に対してカルシウムイオノフォアであるイオノマイシンを添加した。イオノマイシンは細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇を引き起こすことが知られている。結果として、イオノマイシン添加直後に蛍光シグナル上昇が確認された。このことから、APDAP-rhod が細胞内  $Ca^{2+}$  濃度変化に応答することが示された。

また、高親和性  $Ca^{2+}$  プローブと APDAP-rhod の蛍光応答の違いを比較するため、高親和性  $Ca^{2+}$  プローブ Fluo-4 と共染色したラット海馬神経細胞へのグルタミン酸添加実験を行った (図 6)。グルタミン酸は、培養期間の長い神経細胞において 2 度の  $Ca^{2+}$  濃度上昇を引き起こすが、2 段階目の上昇が 1 段階目よりも大きいことが知られている。Fluo-4 の蛍光強度は 1 段階目で飽和してしまい、注目した二つの細胞について類似の時間変化を辿った。一方、APDAP-rhod は細胞 1 においてのみ 2 段階目の蛍光シグナル上昇を示した。Fluo-4 では検出できない細胞ごとの  $Ca^{2+}$  濃度変化の違いを可視化することに成功したことから、開発した APDAP プローブを低親和性  $Ca^{2+}$  プローブとして細胞イメージングに応用できる可能性が示唆された。

$Ca^{2+}$  の細胞内濃度範囲は幅広く、通常用いられる高親和性  $Ca^{2+}$  プローブがイメージングに適しない場合も存在する。高濃度域の  $Ca^{2+}$  濃度変化を検出するために、低親和性  $Ca^{2+}$  プローブがこれまでに数種開発されてきた。既存の低親和性  $Ca^{2+}$  プローブの解離定数は 20–300  $\mu M$  程度であるが、本研究で開発したプローブの解離定数はこれらよりも大きいことから、 $Ca^{2+}$  濃度が mM レベルである細胞外  $Ca^{2+}$  イメージングへの応用が期待できる。さらに、タグタンパク質リガンドを導入して細胞内局在性を付与することで、 $Ca^{2+}$  濃度が数百  $\mu M$  から 1 mM まで変化することが知られているゴルジ体や小胞体といった特定のオルガネラにおける  $Ca^{2+}$  イメージングへの応用も期待される。

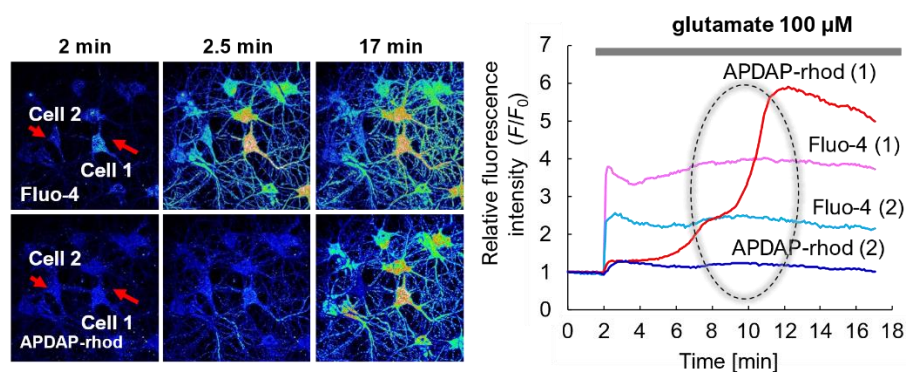


図 6 APDAP-rhod を用いたラット海馬神経細胞におけるグルタミン酸応答のイメージング

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Akihiro Sakama, Yutaka Shindo, Rei Kumada, Naoko Iwasawa, Daniel Citterio, Kotaro Oka, Yuki Hiruta
2. 発表標題 Development of near-infrared fluorescent probe for organelle-specific detection of magnesium ion
3. 学会等名 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 熊田 怜、坂間 亮浩、新藤 豊、岩澤 尚子、岡 浩太郎、チッテリオ ダニエル、蛭田 勇樹
2. 発表標題 ホスフィン酸リガンドを有する蛍光プローブの開発と細胞イメージングへの応用
3. 学会等名 新学術領域「シンギュラリティ生物学」成果公開シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 黒沼柚花、熊田 怜、坂間 亮浩、新藤 豊、岡 浩太郎、チッテリオ ダニエル、蛭田 勇樹
2. 発表標題 ホスフィン酸リガンドを有するレシオメトリック型Mg <sup>2+</sup> 蛍光プローブの開発と細胞イメージングへの応用
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会（2023）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 坂間 亮浩、熊田 怜、新藤 豊、岩澤 尚子、チッテリオ ダニエル、岡 浩太郎、蛭田 勇樹
2. 発表標題 細胞内遊離マグネシウムイオン動態の選択的可視化を可能にする新規蛍光プローブの開発
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会（2023）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 黒沼 柚花、熊田 怜、坂間 亮浩、チツテリオ ダニエル、蛭田 勇樹
2. 発表標題 ホスフィン酸リガンドを有するレシオメトリック型蛍光プローブ
3. 学会等名 第2回生命金属科学シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 坂間 亮浩、熊田 怜、新藤 豊、岩澤 尚子、チツテリオ ダニエル、岡 浩太郎、蛭田 勇樹
2. 発表標題 ホスフィン酸リガンドを有する蛍光プローブの開発と細胞イメージングへの応用
3. 学会等名 第2回生命金属科学シンポジウム
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------