

平成 30 年 5 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03120

研究課題名(和文) 機能性分子 - 蛋白質のハイブリッド設計に基づく細胞機能の可視化と光制御

研究課題名(英文) Imaging and photoregulation of cellular functions by using functional molecule-protein hybrid probes

研究代表者

水上 進 (MIZUKAMI, Shin)

東北大学・多元物質科学研究所・教授

研究者番号：30420433

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：HaloTagにラベル化可能なクロロアルキル基を持つ蛍光プローブMGHを開発した。HaloTagにラベルしたMGHは投与24時間後においても十分に細胞内に留まっていた。続いて、アポトーシス細胞のMg<sup>2+</sup>イメージングの結果、細胞縮小の後、遊離Mg<sup>2+</sup>濃度が増大した。この細胞内遊離Mg<sup>2+</sup>濃度上昇がMg-ATPから放出されたことを示した。また、高選択的Mg<sup>2+</sup>蛍光プローブMGQ-1およびMGQ-2を開発した。MGQ-2のMg<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>に対するK<sub>d</sub>はpH 7.4の緩衝液中でそれぞれ0.27 mM、1.5 mMであり、Mg-ATPの生理的濃度範囲では配位しないことが確認された。

研究成果の概要(英文)：We developed a fluorescent probe MGH with a chloroalkyl group, which can be labeled on a HaloTag. By labeling HaloTag expressed in living cells, MGH remained within living cells sufficiently even after 24 h of the treatment. Then, we attempted intracellular Mg<sup>2+</sup> imaging during apoptosis, and visualized the free Mg<sup>2+</sup> concentration increase after the apoptotic cell shrinkage. Various analyses indicated that the increase in intracellular free Mg<sup>2+</sup> concentration during apoptosis was the result of release from Mg-ATP. We also developed fluorescent probes MGQ-1 and MGQ-2 that show high selectivity for Mg<sup>2+</sup>. The dissociation constants of MGQ-2 for Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> were 0.27 mM and 1.5 mM, respectively, in buffer solution (pH 7.4), and MGQ-2 did not coordinate in the physiological concentration range of Mg-ATP.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：蛍光イメージング タンパク質ラベル化 Mg<sup>2+</sup>

### 1. 研究開始当初の背景

生細胞における生体分子の挙動や機能の時空間的情報を調べるには、蛍光イメージングが有用である。蛍光イメージングで用いる蛍光プローブは低分子プローブと蛋白質プローブに大別され、それぞれ生物学者、化学者により独自に開発されてきた。両者には相補的な長所・短所が存在するが、両者の長所を併せ持ち、短所を補完する低分子-蛋白質ハイブリッド分子は、生命原理や疾患機構の解明に極めて有用であることが期待できる。低分子と蛋白質を融合させる手法の一つに蛋白質ラベル化技術がある。タグ蛋白質を用いる HaloTag や SNAP-tag などの市販ラベル化技術は、標的蛋白質に様々な機能性分子をラベルすることを可能にした。蛋白質ラベル化技術によって、低分子-蛋白質ハイブリッド分子を生きた細胞表面あるいは細胞内に創り出せれば、既存の蛍光プローブでは困難な様々な実験が可能になる。

研究代表者らは、機能性低分子-蛋白質ハイブリッド分子を創製する為に、独自の蛋白質ラベル化技術を開発してきた。BL-tag 技術と名付けたこのラベル化技術は、細菌酵素-lactamase の変異体をタグ (BL-tag) として選択し、ラクタム抗生物質をその特異的リガンドに使用する技術である (S. Mizukami *et al.*, *JACS* 2009, 131, 5016)。リガンド構造の精密設計により、これまでに様々な機能性プローブを開発してきた (S. Mizukami *et al.*, *Acc. Chem. Res.* 2014, 47, 247)。とりわけ、リガンドであるセファロスピリンの特性を生かした「未反応プローブの洗浄を必要としない高速発蛍光ラベル化」(S. Mizukami *et al.*, *JACS* 2012, 134, 1623) は、原理的に HaloTag では達成困難な技術である。

### 2. 研究の目的

機能性低分子-蛋白質ハイブリッド分子を培養細胞条件下で創り出すことにより、細胞内局所における生体分子ダイナミクスを可視化する技術を開発する。

細胞内の遊離  $Mg^{2+}$  は、その重要性が指摘されているにもかかわらずダイナミクスの解明は全く進んでいない。その理由として、以下の(1)~(3)が挙げられる。

(1) 近年、様々な  $Mg^{2+}$  トランスポーターがクローニングされているが、細胞内  $Mg^{2+}$  濃度の時空間的分布に関する知見は皆無である

(2) 遺伝子でコードできる  $Mg^{2+}$  選択的結合ペプチドモチーフが見つかっていない

(3) 細胞内  $Mg^{2+}$  の濃度変動は  $Ca^{2+}$  と比較して遅い(分~時間のオーダー)為、長時間測定が必要である。

そこで、低分子-蛋白質ハイブリッドプローブを開発し、細胞内局所の遊離  $Mg^{2+}$  を可視化する技術を開発する。

### 3. 研究の方法

(1) 生細胞内で発現させたタグタンパク質に結合可能な新規  $Mg^{2+}$  蛍光プローブを開発した。続いて、核や細胞膜内葉などの細胞内局所にタグタンパク質を発現させ、そこに  $Mg^{2+}$  プローブを特異的に共有結合させることで、特定のオルガネラや細胞内ドメインにおける  $Mg^{2+}$  の可視化を試みた。また、アポトーシスにおける遊離  $Mg^{2+}$  のイメージングを行った。

(2) オルガネラ内の  $Mg^{2+}$  の選択的可視化を達成する為の蛍光プローブの開発を行った。開発したプローブの細胞内  $Mg^{2+}$  の検出能は、 $Mg^{2+}$  トランスポーター-CNNM4 を発現させた細胞にプローブと 40 mM の  $Mg^{2+}$  を加え、細胞外液を  $Mg^{2+}$  を含まない緩衝液に交換して細胞内  $Mg^{2+}$  を排出させることで行った。

### 4. 研究成果

(1) 市販の Magnesium Green を基本骨格として持ち、HaloTag にラベル化可能なクロロアルキル基を持つ新規蛍光プローブ MGH を開発した。生細胞内に HaloTag を発現させ、その細胞内滞留性を調べた。その結果、プローブ投与から 24 時間後においても細胞内から十分な蛍光が観察され、細胞内  $Mg^{2+}$  動態の長時間解析も可能となった。

次に、アポトーシス時の細胞内  $Mg^{2+}$  動態のイメージングを試みた。アポトーシスは数時間におよぶ細胞内イベントであり、既存の低分子  $Mg^{2+}$  プローブではリアルタイム解析が不可能であった。新規プローブを用いて解析した結果、アポトーシスによる細胞縮小の後、細胞内  $Mg^{2+}$  濃度の増大が見られた。また、細胞内 ATP 濃度との強い相関も見られ、阻害剤を用いた実験とも併せて、アポトーシスにおける細胞内  $Mg^{2+}$  濃度上昇が、細胞内 ATP に配位していた  $Mg^{2+}$  が解離した結果であると結論付けた。

(2) 小胞体などのオルガネラ内では  $Ca^{2+}$  濃度が高く、そのような部位において  $Mg^{2+}$  を選択的に可視化する為には、より選択性の高いプローブ開発が求められる。しかしながら、これまでその重要性は認識されながら、 $Ca^{2+}$  と比較して  $Mg^{2+}$  により高い選択性を示すプローブはほとんど開発されてこなかった。そこでまず、 $Ca^{2+}$  と比較してより  $Mg^{2+}$  に選択的な配位子構造の精査を行った結果、新たな  $Mg^{2+}$  選択的配位子として 2,8-dicarboxy-quinoline (DCQ) を見出した。この配位子をもとに蛍光プローブへと誘導体化を行い、 $Mg^{2+}$  に対して非常に高い選択性を示す蛍光プローブ MGQ-1 および MGQ-2 の開発に成功した。

MGQ-2 の蛍光スペクトルは、 $Mg^{2+}$  濃度を増大させるにつれて蛍光強度が減少した。これは光誘起電子移動によるものと推察された。また、MGQ-2 の  $Mg^{2+}$  に対する  $K_d$  は pH 7.4 の緩衝液中では 0.27 mM であったのに対し、 $Ca^{2+}$  に対する  $K_d$  は 1.5 mM とより大きな値を示した。また、吸収スペクトル測定により MGQ-2 は

Mg-ATP への親和性は極めて低く、Mg-ATP の生理的濃度範囲においては配位しないことが確認された。

#### 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8件)

Yusuke Matsui, Shin Mizukami, Kazuya Kikuchi “Ratiometric Imaging of Intracellular Mg<sup>2+</sup> Dynamics Using a Red Fluorescent Turn-off Probe and a Green Fluorescent Turn-on Probe”, 査読有, *Chem. Lett.* **2018**, *47*, 23-26.  
DOI: 10.1246/cl.170918

Ryota Sato, Jun Kozuka, Masahiro Ueda, Reiko Mishima, Yutaro Kumagai, Akimasa Yoshimura, Masafumi Minoshima, Shin Mizukami, Kazuya Kikuchi “Intracellular protein-labeling probes for multicolor single-molecule imaging of immune receptor-adaptor molecular dynamics”, 査読有, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 17397-17404.  
DOI: 10.1021/jacs.7b08262

Yusuke Matsui, Yosuke Funato, Hiromi Imamura, Hiroaki Miki, Shin Mizukami, Kazuya Kikuchi “Visualization of Long-term Mg<sup>2+</sup> Dynamics in Apoptotic Cells with a Novel Targetable Fluorescent Probe”, 査読有, *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 8255-8264.  
DOI: 10.1039/c6sc04435b

Yusuke Matsui, Kalyan K. Sadhu, Shin Mizukami, Kazuya Kikuchi “Highly Selective Tridentate Fluorescent Probes for Visualizing Intracellular Mg<sup>2+</sup> Dynamics without Interference from Ca<sup>2+</sup> Fluctuation”, 査読有, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 10644-10647.  
DOI: 10.1039/c7cc06141b

Shin Mizukami, Masayoshi Kashibe, Kengo Matsumoto, Yuichiro Hori, Kazuya Kikuchi “Enzyme-Triggered Compound Release using Functionalized Antimicrobial Peptide Derivatives”, 査読有, *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 3047-3053.  
DOI: 10.1039/c6sc04435b

Hiroki Maeda, Toshiyuki Kowada, Junichi Kikuta, Masayuki Furuya, Mai Shirazaki, Shin Mizukami, Masaru Ishii, Kazuya Kikuchi “Real-Time Intravital Imaging of pH Variation Associated with Osteoclast Activity”, 査読有, *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12*, 579-585.  
DOI: 10.1038/nchembio.2096

Shingo Sotoma, Jun Imura, Ryuji Igarashi, Koichiro M. Hirose, Hidenori Ohnishi, Shin Mizukami, Kazuya

Kikuchi, Takahiro K. Fujiwara, Masahiro Shirakawa, Hidehito Tochio “Selective Labeling of Proteins on Living Cell Membranes Using Fluorescent Nanodiamond Probes”, 査読有, *Nanomaterials* **2016**, *6*, 56.  
DOI: 10.3390/nano6040056

Zhanghua Zeng, Shin Mizukami, Katsumasa Fujita, Kazuya Kikuchi “An Enzyme-Responsive Metal-Enhanced Near-Infrared Fluorescence Sensor Based on Functionalized Gold Nanoparticles”, 査読有, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 4934-4939.  
DOI: 10.1039/c4sc03549f

##### [学会発表](計34件)

水上進, 分子のレジデンス制御を設計指針とした生体解析プローブの開発, 日本化学会第98春季年会, 2018年

水上進, 機能性分子局在化技術のバイオイメージングへの展開, 日本化学会第98春季年会, 2018年

水上進, 機能性分子設計に基づく生体イメージング技術の開発, ニコンイメージングセンター学術講演会, 2017年

水上進, 低分子~ナノ粒子プローブによる生体内現象の可視化, 2017年光化学討論会(市民公開講座)バイオイメージング最前線講演会, 2017年

水上進, 機能性含フッ素プローブの開発とin vivoイメージングへの応用, 第7回フッ素化学若手の会, 2017年

水上進, 分子・材料の機能設計に基づく生体解析技術の開発, 第34回無機・分析化学コロキウム, 2017年

松井勇輔, 水上進, 船戸洋佑, 今村博臣, 三木裕明, 菊地和也, タンパク質ラベル化型 Mg<sup>2+</sup>プローブによるアポトーシス時の細胞内 Mg<sup>2+</sup>動態イメージング, 日本化学会第97春季年会, 2017年  
井元琢真, 水上進, 菊地和也, 有機蛍光色素の光安定性に及ぼす希土類イオン添加の効果, 日本化学会第97春季年会, 2017年

水上進, Development of Bioanalytical Technologies Based on Rational Design of Organic-Nano Hybrid Materials, 第94回日本生理学会, 2017年

水上進, 機能性プローブ設計に基づく生体機能解析技術の開発, 愛媛大学大学院医学研究科・分子病態医学セミナー, 2017年

水上進, Development of bioanalytical tools based on organic-inorganic hybrid nanomaterials, HOKUDAI-NCTU International Joint Symposium on Nano, Opto and Bio Sciences, 2017年

松井勇輔, 水上進, 船戸洋佑, 今村博臣, 三木裕明, 菊地和也, タンパク質ラベル

化型  $Mg^{2+}$ プローブによるアポトーシス時の細胞内  $Mg^{2+}$ 動態イメージング, 第10回バイオ関連化学合同シンポジウム, 2016年

鈴木駿佑, 山縣勇介, 水上進, 菊地和也, 標的タンパク質周辺の酸性環境を可視化するpH応答性蛍光プローブの開発, 第10回バイオ関連化学合同シンポジウム, 2016年

Takuma Imoto, Shin Mizukami, Kazuya Kikuchi, Strategy to improve photostability of fluorescent dyes by using lanthanide ion, Labeling & Nanoscopy 2016, 2016年

Kazuki Akazawa, Fuminori Sugihara, Yoshichika Yoshioka, Shin Mizukami, Kazuya Kikuchi, Development of Activatable  $^{19}F$  MRI Nanoprobes Using Perfluorocarbon Encapsulated in Silica Nanoparticle, World molecular imaging congress 2016, 2016年

水上進, Bioimaging and bioanalytical applications with middle molecules on nanomaterials, Satellite International Mini Symposium on Middle Molecular Strategy in Sendai, 2016年

水上進, Development of molecular imaging probes constructed of small molecules, proteins, and nanomaterials, 化学系学協会東北大会, 2016年

水上進, Fluorescent probes with molecular targeting property, CWRU-Tohoku 3rd Joint workshop, 2016年

Shin Mizukami, Kazuya Kikuchi, Development of Protein-Tag-Based Research Tools in Living Cell Imaging, Pacificchem 2015, 2015年

松井勇輔, 水上進, 船戸洋佑, 三木裕明, 菊地和也, 細胞内局所の  $Mg^{2+}$ 動態を可視化するための蛍光プローブの開発, 日本分子イメージング学会第10回学術集会, 2015年

他 14 件

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.tagen.tohoku.ac.jp/lab/mizukami/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

水上進 (MIZUKAMI SHIN)

東北大学・多元物質科学研究所・教授

研究者番号: 30420433

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

菊地 和也 (KIKUCHI KAZUYA)

大阪大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号: 70292951

### (4)研究協力者

松井 勇輔 (MATSUI YUSUKE)

大阪大学・大学院工学研究科・大学院生

佐藤 亮太 (SATO RYOTA)

大阪大学・大学院工学研究科・大学院生

赤澤 一樹 (AKAZAWA KAZUKI)

大阪大学・大学院工学研究科・大学院生

鈴木 駿佑 (SUZUKI SHUNSUKE)

大阪大学・大学院工学研究科・大学院生

井元 琢真 (IMOTO TAKUMA)

大阪大学・大学院工学研究科・大学院生