

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05312

研究課題名（和文）様々な代謝経路活性の一細胞検出を可能とする新規蛍光イメージング戦略の開発

研究課題名（英文）Development of novel strategy for fluorescence detection of activity of various metabolic pathways

研究代表者

内之宮 祥平（Uchinomiya, Shohei）

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号：10770498

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：生体内には解糖系など多様な代謝経路が存在し、生体機能に重要な働きをしている。しかし、代謝経路を構成する酵素は基質選択性が高いため、これらを検出可能な蛍光プローブの開発は困難である。そこで本研究では、この基質選択性の問題をクリアし様々な代謝経路の検出に適応可能な汎用性の高い蛍光プローブデザインを提案する。具体的にはフルオロ基部位を導入した基質とシリルエーテル保護基を有する蛍光色素を用いる。基質が代謝されることでフッ化物イオンを放出し、続くシリル保護基の脱保護によって蛍光Off/Onイメージングを行う戦略である。本手法を用いて、脂肪酸を分解する代謝経路である酸化の性細胞イメージングに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

代謝経路の活性はガンなどの疾病で大きく変化している。このような代謝活性変化は疾病のhallmarkとして知られており、重要な創薬ターゲットでもある。一方、既存の代謝活性を検出する手法は安定同位体標識化合物などに限られている。また、生細胞で酵素活性を検出する手法として蛍光プローブも盛んに開発されているが、基質選択性が高い代謝経路の活性を検出可能なプローブはほとんどない。本研究では、フッ化物イオンの放出とそれに続く脱保護反応を利用した新しい代謝経路活性の蛍光イメージング法を開発した。本成果は代謝経路の簡便な検出を可能とし、薬剤スクリーニングなどへの展開が期待される。

研究成果の概要（英文）：Fluorescent probes play a crucial role in contemporary biological research by facilitating the detection of enzyme activities. However, it is still challenging to detect activities of metabolic pathways due to high substrate specificity of these enzymes. Here, we developed a novel enzymatic assay that utilizes a pair of a fluorinated substrate and a dialkoxysilylated fluorogenic probe. The reaction of fluorinated substrate and the target enzyme results in release of fluoride ion. The fluoride ion subsequently reacts with dialkoxysilylated fluorogenic probe, resulting in turn-on fluorescence imaging of activity of the target enzyme. Using this strategy, we successfully detect the activity of fatty acid beta oxidation pathway in live cells.

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 代謝経路活性 脂肪酸 酸化 シリルエーテル保護基 フッ化物イオン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

代謝経路とは複数の酵素による連続的な反応であり、生命活動に重要な働きをしている。様々な代謝経路の活性は疾病細胞と通常細胞で異なるため、標的経路の活性評価は疾病メカニズムの解明に重要である。最近では細胞ごとの代謝活性の違い(代謝不均一性)が注目されているが、従来の同位体標識化合物を用いた手法では細胞集団の平均値しか得られない。また、PETやMRIによるイメージングが行われているが、分解能が低い一細胞レベルでの評価はできず感度の低さやプローブの半減期の短さも課題である。一方、蛍光イメージングは標的酵素の活性を一細胞レベルかつ簡便・高感度に検出可能であり、代謝研究への応用が期待される。しかし、既存の蛍光プローブは単一の酵素反応を標的としており、複数の酵素からなる代謝経路全体の活性を検出した例はない。さらに、既存の蛍光プローブは比較的基質選択性が低い酵素を標的とするが、代謝経路を構成する酵素は基質選択性が高いためプローブ開発が困難である。このように、ケミカルバイオロジー研究が盛んな現在でも代謝経路酵素の活性を一細胞レベルで検出する手法は未開拓である。

### 2. 研究の目的

本研究では、基質選択性の問題をクリアし様々な代謝経路の検出に適応可能な汎用性の高い蛍光プローブデザインを提案する。さらに、本戦略を用いて疾病での標的経路不均一性の解明や、標的経路下流の生体分子との相関を一細胞レベルで解明することを目的とする。本研究により様々な代謝経路の活性を一細胞レベルで蛍光イメージングする新手法の提供できれば、代謝研究や創薬研究など幅広い分野でのブレークスルーが期待できる。

### 3. 研究の方法

本研究では蛍光色素を基質に直接導入する設計を避け、フルオロ基部位を導入した基質とシリルエーテル保護基を有する蛍光色素を用いる。基質が代謝されることでフッ化物イオンを放出し、続くシリル保護基の脱保護によって蛍光 Off/On イメージングを行う戦略である(図1)。フルオロ基部位の構造が小さいため様々な代謝経路の基質に導入可能であると期待した。

一方、フッ化物イオンとシリルエーテル保護基との反応速度は一般的に低い。例えば、先行研究として、蛍光色素に TBS 基や TBDPS 基シリルエーテル保護基を導入したプローブによって、細胞に添加したフッ化物イオンを検出する例が多く報告されているが、一般的に 100  $\mu$ M から 1 mM の範囲の高濃度のフッ化物イオンを添加する必要がある。一方、電子求引性が高い dialkoxysilyl ether を用いることで、一般的に用いられている alkoxyethyl ether 基と比較して反応速度の向上が報告されている(*J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 2602.)。そこで本研究では、水中で安定かつフッ化物イオンと高い反応速度を示す dialkoxysilyl ether の探索を行った。さらに、見出したシリルエーテル基を蛍光色素に導入し、酵素反応後に放出されるフッ化物イオンを検出可能かを検討した。

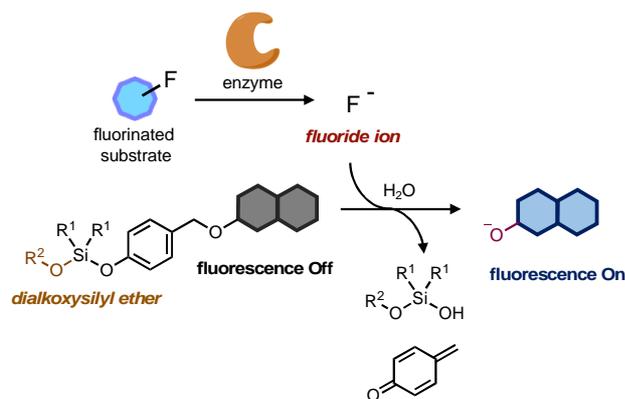


図1.シリルエーテル基の脱保護反応を利用した代謝経路の蛍光イメージング

### 4. 研究成果

まず蛍光色素であるクマリンに様々な骨格の dialkoxysilyl ether を導入したプローブ 1~5 を合成し、水系溶媒 (50 mM HEPEX, 50% methanol) での安定性およびフッ化物イオンとの反応性を評価した(図2)。その結果、プローブ 1, 2, 3 がフッ化物イオンと高い反応性を示すことがわかった。一方、プローブ 3 は水中で不安定であることも分かった。また、プローブ 2 は疎水性が高いため、dialkoxysilyl ether の骨格として isopropoxydiethylsilyl ether 基を見出した。

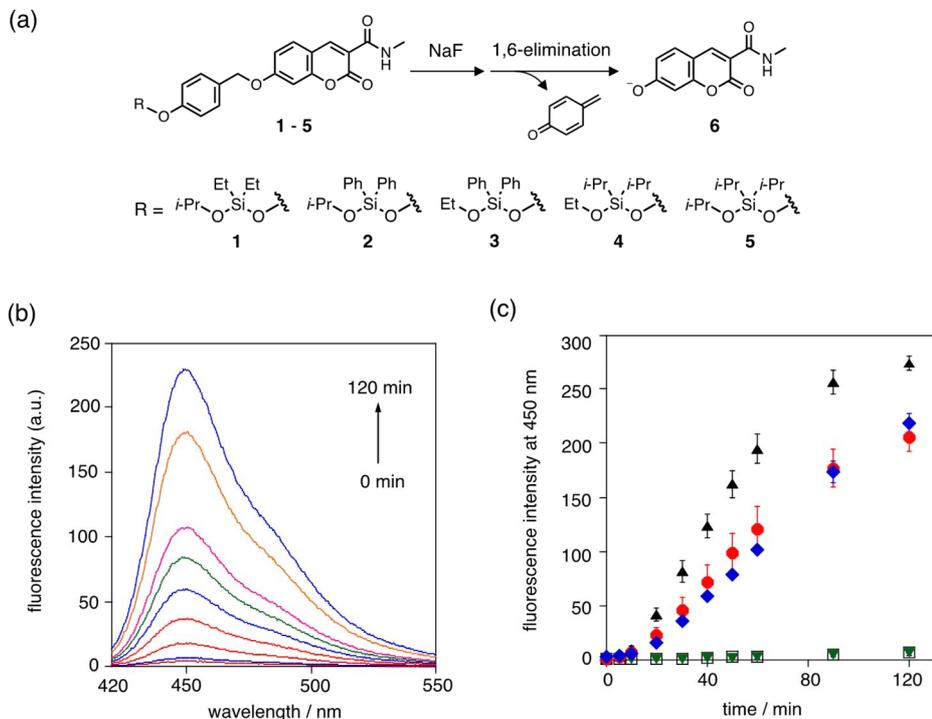
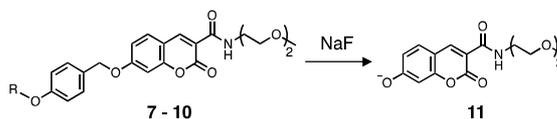


図 2. (a)プローブ 1-5 の構造, (b)NaF(100  $\mu\text{M}$ )存在下でのプローブ 1 の蛍光変化, (c)プローブ 1-5 と NaF(100  $\mu\text{M}$ )との反応性評価

続いて、isopropoxydiethylsilyl ether 基と既存のシリルエーテル保護基との反応性の比較を行った。ここで、より完全水系に近い条件で評価するため、親水性の高いクマリン骨格にシリルエーテル基を導入したプローブ 7-10 を合成した。これらのプローブとフッ化物イオンとの反応性を水系溶媒 (50 mM HEPES, 5% acetonitrile) で評価したところ、プローブ 7 は既存のフッ化物イオン検出で用いられている TBS 基や TBDPS 基と比較して約 90 倍反応速度が高いことが分かった (表 1)。また、加水分解速度も低く、水中で安定であることも分かった。さらに、pH6-8 でも安定であること、フッ化物イオン以外のイオンには応答しないことも確認した。

表 1. プローブ 7-10 のフッ化物イオンとの反応速度および加水分解速度



structure of silyl ether (R)	$k_2$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{hydrolysis}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )
7 $i\text{-Pr-O-Si(Et)}_2$	5.77	$4.70 \times 10^{-6}$
8 $i\text{-Pr-O-Si(Et)}_2$	$6.38 \times 10^{-2}$	$1.98 \times 10^{-6}$
9 $t\text{-Bu-O-Si(Me)}_2$	$1.03 \times 10^{-2}$	$< 1.98 \times 10^{-6}$
10 $i\text{-Pr-O-Si(Et)}_2$	2.15	$8.55 \times 10^{-5}$

最後に、プローブ 7 を用いて酵素反応によって放出されたフッ化物イオンを検出可能か検討した。まず加水分解酵素であるエステラーゼを標的酵素として選択し、*p*-(Fluoromethyl)phenyl acetate を基質として合成した。その結果、プローブ 7、エステラーゼおよび *p*-(Fluoromethyl)phenyl acetate が共存する条件でのみクマリン蛍光の上昇が確認されたことから、プローブ 7 が酵素反応によって生じたフッ化物イオンを検出可能であることが分かった。さらに、本手法を用いて基質選択性が高い代謝経路の活性を検出可能か検討した。解糖系や TCA 回路など、細胞内には様々な代謝経路が存在するが、基質選択性が高いためこれらの標的とした蛍光プローブは開発されていない。今回我々は標的経路として、脂肪酸を分解し ATP 合成に用いられる ATP を生産する脂肪酸分解代謝 (酸化) を選択した (図 3)。酸化を検出するため、基質 13 を設計した (図 13a)。基質 13 は酸化によって分解される過程で、フッ化物イオンを放出する。まず 13 を HepG2 細胞に添加した後、細胞ライセートを作成した。そこにプローブ 7 を添加したところ、蛍光強度の回復がみられた。また、この蛍光は酸化の阻害剤であるエトモキシル添加条件では検出できなかったことから、基質 13 が酸化によって代謝され (図 3b)。最後に、本手法が生細胞での酸化検出が可能かを検討した。基質 13 を HepG2 細胞に添加

し、その後プローブ7を添加したところ、細胞内からクマリン蛍光が検出された。この蛍光はエトモキシル処理した細胞では検出されなかったことから、本手法が生細胞での 酸化活性を検出可能であることも分かった ( 図 3c )。

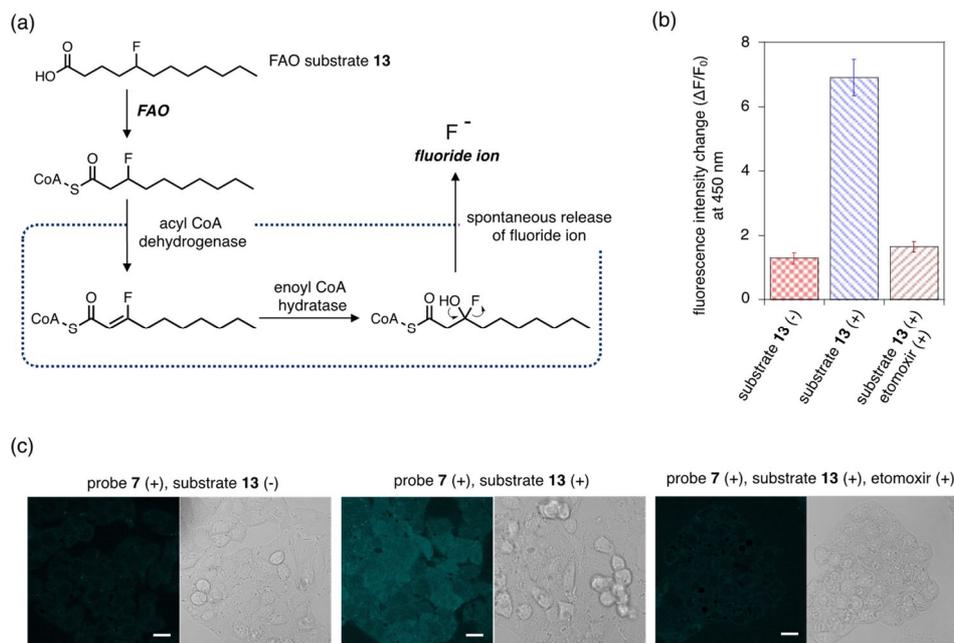


図 3. (a) 酸化による基質 13 からのフッ化物イオンの放出, (b)細胞ライセートでの 酸化検出, (c)生細胞での 酸化検出

以上より、本手法によって基質選択性の高い酵素の活性を生細胞でも検出可能であることが分かった。今後は脂肪酸 酸化以外の代謝経路の検出へと応用する予定である。本成果は *Chemistry Letters* 誌に掲載された (*Chemistry Letters*, volume 53, 3, upae031 (2024), Editor's Choice.)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kanegae Anna, Takata Yusuke, Takashima Ippei, Uchinomiya Shohei, Kawagoe Ryosuke, Usui Kazuteru, Yamashita Akira, Wongkongkatep Jirarut, Sugimoto Manabu, Ojida Akio	4. 巻 4
2. 論文標題 A multicolor and ratiometric fluorescent sensing platform for metal ions based on arene?metal-ion contact	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Chemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42004-021-00541-y	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 Sato Daisuke, Matsuo Yuya, Nishime Yuki, Uchinomiya Shohei, Ojida Akio	4. 巻 53
2. 論文標題 In situ detection of enzymatic activities by the bioorthogonal reaction-coupled assay using a dialkoxysilylated fluorogenic probe	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/chemle/upae031	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20件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 内之宮祥平, 永浦智樹, 松永直哉, 鶴田朗人, 大戸茂弘, 王子田彰夫
2. 発表標題 ケミカルプローブによる脂肪酸を分解する代謝経路の蛍光検出
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第16回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今村拓哉, 末次春花, 善明直輝, 田畑香織, 内之宮祥平, 王子田彰夫
2. 発表標題 光反応基によるHis タグ導入細胞膜タンパク質の選択的ラベル化と近位ラベル化への展開
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第16回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 末次春花, 今村拓哉, 善明直輝, 田畑香織, 内之宮祥平, 王子田彰夫
2. 発表標題 光反応を用いた細胞表面受容体の迅速なラベル化とインターラクトーム解析への応用
3. 学会等名 第59回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松尾祐治, 永浦智樹, 内之宮祥平, 王子田彰夫
2. 発表標題 ケミカルプローブによる脂肪酸分解経路の検出
3. 学会等名 第59回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松本侑也, 善明直輝, 安田齊弘, 内之宮祥平, 進藤直哉, 田畑香織, 王子田彰夫
2. 発表標題 システイン化学修飾によるタンパク質の切断法の開発
3. 学会等名 第59回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 善明直輝, 松本侑也, 安田齊弘, 内之宮祥平, 進藤直哉, 田畑香織, 王子田彰夫
2. 発表標題 システインホルミル化によるタンパク質部位選択的な化学切断法の開発
3. 学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 末次春花, 今村拓哉, 善明直輝, 田畑香織, 内之宮祥平, 王子田彰夫,
2. 発表標題 光反応を用いた細胞表層受容体の迅速なラベル化とインターラクトーム解析への応用
3. 学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松尾祐治, 永浦智樹, 内之宮祥平, 王子田彰夫
2. 発表標題 ケミカルプローブによるペルオキシソーム内脂肪酸分解経路の検出
3. 学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松尾祐治, 永浦智樹, 内之宮祥平, 王子田彰夫
2. 発表標題 キノンメチド放出プローブによるペルオキシソーム 酸化の蛍光イメージング
3. 学会等名 日本化学会 第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 末次春花, 今村拓哉, 善明直輝, 田畑香織, 内之宮祥平, 王子田彰夫
2. 発表標題 光反応を利用したHisタグ導入受容体の標識と近位ラベル化への応用
3. 学会等名 日本化学会 第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 YIN RUIKANG, 井上和哉, 内之宮祥平, 王子田彰夫
2. 発表標題 FBDD戦略に基づく 酸化を制御するCFA型コバレント阻害剤の探索
3. 学会等名 日本化学会 第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松本侑也, 善明直輝, 安田斉弘, 内之宮祥平, 進藤直哉, 田畑香織, 王子田彰夫
2. 発表標題 システイン化学修飾を利用したタンパク質化学切断法の開発: システインホルミル化の基本的化学特性
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 善明直輝, 松本侑也, 安田斉弘, 内之宮祥平, 進藤直哉, 田畑香織, 王子田彰夫
2. 発表標題 システイン化学修飾を利用したタンパク質化学切断法の開発: Cysホルミル化によるタンパク質配列選択的切断および細胞表層応用
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shohei UCHINOMIYA, Tomoki NAGAUURA, Yuya MATSUO, Akito TSURUTA, Naoya MATSUNAGA, Shigehiro OHDO, Akio OJIDA
2. 発表標題 Fluorescence imaging of fatty acid beta oxidation pathways in cells and tissues with chemical probes
3. 学会等名 日本薬学会第143年会次世代薬学アジアシンポジウム3
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 内之宮祥平, 永浦智樹, 松永直哉, 鶴田朗人, 井上和哉, 大戸茂弘, 王子田彰夫
2. 発表標題 Activity-Based Probelによる生体組織での脂肪酸分解経路の蛍光イメージング
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤大輔, 内之宮祥平, 王子田彰夫
2. 発表標題 生体直交的脱シリル化反応を用いたケミカルプローブの開発
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 善明直輝, 安田齊弘, 松本侑也, 内之宮祥平, 王子田彰夫
2. 発表標題 S-ホルミル化を利用した標的タンパク質の化学選択的切断法の開発
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今村拓哉, 末次春花, 善明直輝, 田畑香織, 内之宮祥平, 王子田彰夫
2. 発表標題 光反応基によるHisタグ導入膜タンパク質の選択的ラベル化
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今村拓哉, 末次春花, 善明直輝, 田畑香織, 内之宮祥平, 王子田彰夫
2. 発表標題 光反応を用いた迅速な細胞表層受容体の選択的ラベリング
3. 学会等名 第38回日本薬学会九州山口支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上和哉, Yin Ruikang, 内之宮祥平, 王子田彰夫
2. 発表標題 蛍光プローブを用いた脂肪酸 酸化阻害剤の探索
3. 学会等名 第15回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2021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