

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 8 日現在

機関番号：17104

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2010 ~ 2012

課題番号：22550154

研究課題名（和文） 細胞内カリウムイオン蛍光イメージング試薬の開発

研究課題名（英文） Development of fluorometric potassium ion imaging reagent in a cell

研究代表者

竹中 繁織 (TAKENAKA SHIGEORI)

九州工業大学・工学研究院・教授

研究者番号：60188208

研究成果の概要（和文）：

本研究では、オリゴヌクレオチドとペプチドとのコンジュゲートを合成し、これに蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 可能な二つの蛍光色素とビオチンの導入によって K⁺ 蛍光検出試薬 PSO-5 の開発に成功した。PSO-5 を用いることによってアポトーシス誘導剤による細胞内からの K⁺ 流出の蛍光イメージングに成功した。この結果 PSO-5 がアポトーシスの初期段階におけるカスパーゼ活性化やアポトーシス性容積減少と K⁺ 濃度変化との関係を解析する有用なツールとして利用できることが示された。

研究成果の概要（英文）：In this project, we successfully synthesized a fluorometric potassium detecting reagent, PSO-5, consisted of thrombin binding aptamer (TBA) carrying FAM at the 5'-end conjugated with a peptide carrying TAMRA and biotin at the middle and at its C-terminus, respectively. K⁺ in the cell was visualized based on the FRET ratio of the ternary complex of streptavidin with PSO-5 and biotinylated nuclear export signal peptide. Change of FRET signal of PSO-5 was observed that indicated a decrease in K⁺ concentration in the cell upon addition of apoptosis-inducing drug to monitor K⁺ efflux from the cell.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：ナノバイオ、分子認識、細胞・組織、生体分子、蛍光プローブ

1. 研究開始当初の背景

アポトーシスはあらかじめ遺伝的プログラムに組み込まれた管理・調節された細胞死のことであり、組織の恒常性維持に必要なものであるが、そのメカニズムの詳細な解明は十分になされていない。癌細胞特異的なアポト

ーシスが誘導できれば癌の治療につながることからこの解明につながる研究は重要である。これまでアポトーシスが起る際に必要な現象がいくつか知られている(図1)。その中の一つが K⁺ に関する現象である。細胞内 K⁺ が減少することにより、細胞の収縮、すな

わちアポトーシス性容積減少、これによる細胞内からの水の流出、カスパーゼ活性化、DNAの切断、アポトーシス小体の形成などの著しい形態変化が知られている。また、初期の段階でK⁺の減少を防ぐことによってアポトーシスを止めることができたとの報告例もある。従って、この過程の詳細な解析のためには細胞内K⁺濃度変化を可視化できる蛍光イメージング試薬の開発が重要なテーマとなる。この観点からこれまで細胞内のK⁺濃度を測定するための蛍光試薬が研究されてきたが、試薬の蛍光強度が使用する蛍光顕微鏡に合っていないことやK⁺とナトリウムイオン(Na⁺)との選択性が低いこと等から細胞内のK⁺の蛍光イメージングへの成功例は報告されていない。

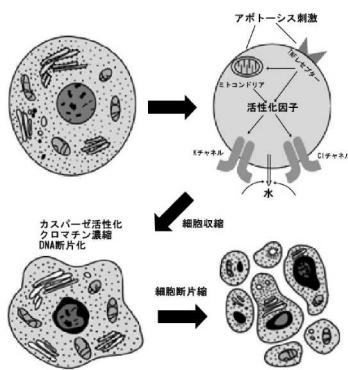


図1. アポトーシス初期のイベント。

2. 研究の目的

申請者は、4本鎖構造が形成可能なグアニン(G)-リッチオリゴヌクレオチドの両末端にFRET可能な色素であるFAMとTAMRAを導入することにより水溶性が極めて高いK⁺蛍光試薬PSOの開発に成功した(図2A, Potassium sensing oligonucleotideの頭文字を取ってPSOと名付けた)。これは、図2Bに示すようにG-リッチオリゴヌクレオチドがK⁺によって4本鎖構造を形成することによって二つの色素の距離が大きく変化し、FRET効率が減少することに基づいている。G-リッチオリゴヌクレオチドとしてヒトテロメアDNAのTTAGGG繰り返し配列を用いることによってK⁺に対する解離定数K_d=0.28 mM、Na⁺に対するK⁺選択性が約207倍と極めて高いものであった。

これは細胞間に存在する過剰なNa⁺の存在下でのK⁺濃度変化をモニターできる可能性を示し、興味深いものであった。また、ヒトテロメアDNA配列を有するオリゴヌクレオチドの両置換基末端にピレンを導入したPSO4を設計・合成した。K⁺添加に伴うPSO4のゲル電気泳動、吸収、円二色性、蛍光、蛍光偏光スペクトル変化等の解析によってPSO4はヒトテロメアDNAの種々の4本鎖構造(最近にな

ってbasket, chair, propeller, hybrid I, hybrid II型の五つ)のうちchair型の時だけ効果的なFRETが見られると予測された。そこでG-リッチオリゴヌクレオチドにトロンビン結合アプタマー(TBA, Chair型のみ)配列を導入することによってより高いFRET

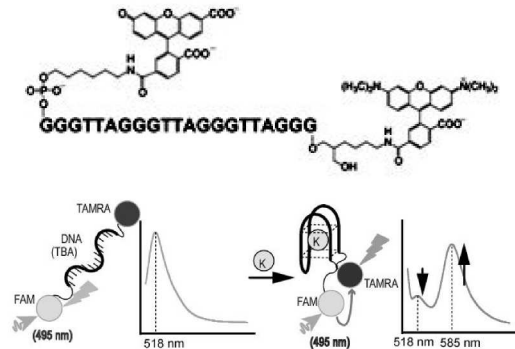


図2. PSO1の構造(A)とPSOのK⁺による4本鎖形成の概念(B)。

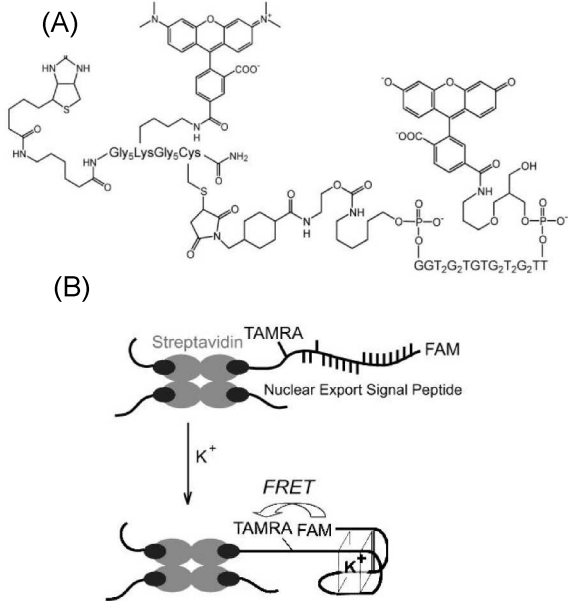


図3. (A)PSO5とPSO6の構造, (B)PSO6-ストレプトアビジン-ピオチン化核排出ペプチド複合体模式図。

効率を示すPSO2の合成に成功した。しかし、予備的実験では細胞への導入によって73%が細胞死を起こすことがわかった。これは、TBA配列が核内に存在するヌクレオリンという蛋白質に結合したためと考えられた。事実、G-リッチオリゴヌクレオチドを細胞に導入すると細胞死を起こすことが知られており、in vitroの実験でG-リッチオリゴヌクレオチドとヌクレオリンが結合することも知られている。

そこで二つのFRET色素に加えピオチンを導入したPSO5(図3A)を合成した。これを

ストレプトアビジンと結合させ同様に細胞へ導入したが、細胞毒性は全く見られなかった。このことは PS05 をアビジンに結合させることによってヌクレオリンとの相互作用が抑制されたものと考えられた。このような条件によっても PS05 の核への移行が観察されたが、一部は細胞質に留まっていることがわかった。しかしながら、PS05 の合成収率は低く、また、精製も困難であったのでこれ以上の研究はできなかった。これらの結果を踏まえ、ペプチドをリンカーとする PS05 のドナー・アクセプター間距離を短縮した PS06 (図 4, n=3) を用いて、ペプチド長が及ぼす影響について検討した。本研究ではペプチド-オリゴヌクレオチドコンジュゲートを利用してビオチン、FAM、TAMRA を導入した PS06 の合成を行い、細胞内での挙動を解析すると共に高性能な K⁺濃度の蛍光イメージング試薬を開発することを目的とする。ごく最近の予備的検討では PS05 とアビジンとの 1:1 複合体にビオチン化した核排出ペプチドをさらに複合体化することによって細胞質の K⁺の蛍光イメージングが可能なが示唆された (図 3B)。この詳細についても検討を加える。

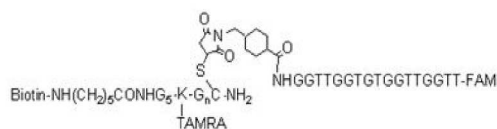


図 4. PS06 (n = 3)の構造. PS05 は n=5 である。

本研究では PS05 または PS06 を用いて細胞内の K⁺応答を蛍光変化としてイメージングできる高感度システムを確立する。本手法を用いることによってアポトーシス過程における K⁺イオンの役割について新たな知見が得られるものと確信している。

3. 研究の方法

(1) 分光学的評価

PS05 の K⁺定量性能を評価する為に、K⁺もしくは Na⁺を添加した時の蛍光・円二色性スペクトルを測定した。蛍光スペクトルは 0.2 μM PS05 の 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) 溶液に K⁺もしくは Na⁺を添加し、励起波長 495 nm で測定した。0.3 μM Streptavidin 存在下、非存在下で 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) 中で KCl, NaCl, MgCl₂, CaCl₂, LiCl, AcONH₄⁺ 滴下に伴う 0.20 μM PS0-5 の蛍光スペクトルを測定した。円二色性スペクトルは 2 μM PS05 の 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) 溶液に K⁺もしくは Na⁺を添加して測定した。また、同条件下各種イオン添加に伴う PS05 の円二色性スペクトル測定も行った。測定温度はいずれも 37°C で行った。

(2) PS05 の細胞導入

PS0-5 を Streptavidin と Biotin 化 PKI (核排出ペプチド) と複合体を形成させてから HeLa 細胞内にビーズロード方で導入し、5 μM Ouabain, Amphotericin B in DMSO を DMEM 培地に加えアポトーシス (自然死) を起こさせた。アポトーシス時には K⁺が細胞内から流出してくることが知られているので、その K⁺流出を共焦点レーザー स्क্যান顕微鏡で観察した。さらに PS05 を HeLa 細胞の膜に Biotin 修飾 Concanavalin A (細胞膜上の糖鎖に結合できるタンパク質), Streptavidin を介して結合させ、同様にアポトーシス時の K⁺流出を観察した。

(3) アポトーシスに伴う K⁺流失の蛍光イメージング

細胞イメージング実験は、ガラスボトムディッシュ上にコンフルエントに培養した HeLa 細胞を用いた。培養液 (DMEM) を除き、PS05 溶液 (5 μM in PBS buffer) を 25 μL を添加しシリコン化ビーズによるビーズロードを行った。その後、PBS でビーズを洗浄後、10% FBS を含む DMEM を 1.5 mL 加え 10% CO₂, 37°C で 4 時間インキュベートして PS05 を HeLa 細胞に導入した。その後、共焦点レーザー顕微鏡システムにセットし、Amphotericin B, Bumetanide, Ouabain 各 10 μM の混合液を 500 μL 添加して 488 nm レーザー励起による蛍光画像を 10 分ごとに撮影した。

4. 研究成果

(1) PS06 の性能評価

0.2 μM PS06 を含む 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.40) 溶液に対して、25°C で KCl, NaCl 添加に伴う蛍光スペクトル測定 (励起波長 495 nm, 560 nm) を行った。TAMRA 由来の 585 nm の蛍光強度を FAM 由来の 518 nm の蛍光強度で割った蛍光強度比 (レシオ値) を算出した。

励起波長 495 nm において、KCl 添加に伴ってドナー色素 (FAM) 由来の 518 nm での蛍光強度は 78.4% 減少、アクセプター色素 (TAMRA) 由来である 585 nm の蛍光強度は 45.2% 増加した。これは、TBA が K⁺ を捕捉し、四本鎖構造を形成した結果、色素間距離が近接し FRET が生じた為だと考えられた。一方、NaCl 添加の場合、ドナーの蛍光強度が 6.1% 減少、アクセプターの蛍光強度が 6.4% 増加という小さな変化に留まった。これより、PS06 は K⁺ に対して高い選択性を有していると言える。また、K⁺ 添加によるレシオ値の変化率は PS05 の 480% 増加に対し、PS06 が 744% 増加といった大幅なダイナミックレンジの向上が見られた。PS06 は、K⁺ 非添加ではランダムコイル状態であるので、フレキシブルなペプチド鎖も相まって色素間距離を短くした影響は表れにくく、K⁺ 添加による四本鎖形成後の方がより強く距離の差を反映していると考えられる。また、ペプチドはフレキシブルなリンカーであるので、ランダ

ムコイル状態ではTAMRAがグアニンからの消光を受け易い状態にあり、四本鎖形成によってTAMRAがグアニンから離されて消光が解消されていることが考えられた。ここで、レシオ変化率の濃度分解能の観点から比較すると(表1)、PS06はPS05よりも高濃度域に渡るK⁺定量性能に優れたプローブであり、細胞内での高精度なK⁺イメージングが期待された。

表1. K⁺濃度5-100 mMにおけるレシオ変化率の濃度分解能の比較.

K ⁺ probe	判定濃度域 5~100 mM
PS06	5.8±0.4%/mM
PS05	2.7±0.3%/mM

(2) PS05 の K⁺複合体形成に伴う構造変化

円二色性スペクトル変化からK⁺添加に伴い、295 nm の正のバンド、265 nm の負のバンドそれぞれの強度が上昇した。さらに蛍光スペクトル変化ではK⁺添加に伴いFAM 蛍光強度が減少し、TAMRA 蛍光強度が上昇した。以上から、PS05 はK⁺と結合することでTBA部分が四本鎖構造を形成することでFAMとTAMRAが近接し、結果としてFRET効率が上昇したと考えられる。

(3) PS05 複合体の K⁺特異性

TAMRA および FAM 由来の蛍光をそれぞれ、F₅₈₅、F₅₁₇ として、蛍光レシオ値として、F₅₈₅/F₅₁₇ を求めた。KCl または NaCl の濃度を増加させた時の2つの蛍光色素の強度比から解離定数 K_d を算出した(表2)。PS05 単体に比べ複合体では Na⁺に対する K⁺の選択性が 53 倍から約 240 倍に向上した。この選択性の違いは、Anisotropy 測定から得られた複合体形成前後の蛍光色素対の熱運動性の違いによって説明できた。

表2. TBA 及び PS0-5 の K⁺又は Na⁺ 複合体の安定性.

Probe	K _d /mM		Na ⁺ /K ⁺ 選択性 K _d (Na ⁺)/K _d (K ⁺)
	K ⁺	Na ⁺	
PS0-5	12.1±0.4	639±18	53±10
PS0-5+StAv v+B-NES	2.2±0.4	529±23	241±44

生体内存在濃度の K⁺、Na⁺、Mg²⁺、Ca²⁺、NH₄⁺、H⁺イオンで性能評価を行った。K⁺存在下でのみイオン型4本鎖構造を形成し、FRETによる蛍光強度変化が見られた。その他のイオンでも蛍光強度変化が起きたが、Streptavidin をPS05 に結合させるとその蛍光強度変化は小さいものであった。これは二価イオンにおいてわずかながら分子間パラレル4本鎖を形

成していたものが PS05 に比べ巨大分子の Streptavidin が結合することにより組みにくくなったためであると考えられる。

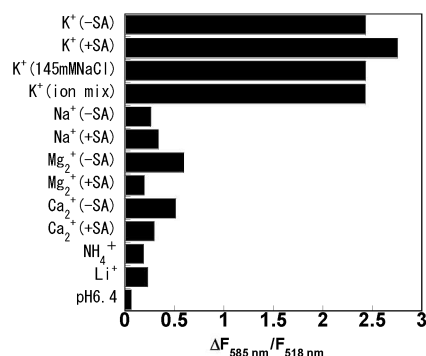


図5. PS0-5 の各種イオンでの蛍光強度比変化. (K⁺, Na⁺=0-150 mM, Mg²⁺, Ca²⁺=0-2 mM, NH₄⁺=0-20 mM, Li⁺=0-150 mM, pH6.4 は pH7.4-pH6.4, ion mix は各金属イオンが最大量存在している状態.

(4) PS05 の細胞導入

PS05 はストレプトアビジンとの複合体として細胞に導入したが、細胞核内への局在化が顕著であった。そこでこの複合体にビオチン修飾した核排出シグナル(NES)ペプチド(Biotin-AC6-WSRSLALKLAGLDI-amide)をさらに複合化したところ図6Aに示すように細胞質が染色され結果として細胞毒性が大幅に改善された。

K⁺添加に伴う4本鎖構造形成によってFRET効率が変化するため、K⁺検出が可能となる(図2B)。PS05の細胞内導入をビーズロード法により行ったが、PS05単独では核へ濃縮されるため、これを回避するために、ストレプトアビジン(StAv)、PS05、ビオチン修飾した核排出シグナル(NES)ペプチド(Biotin-AC6-WSRSLALKLA-GLDI-amide)によるコンジュゲートを作成し、これによる細胞内K⁺検出を試みた。その結果、細胞質が染色され結果として細胞毒性が大幅に改善された。

(5) PS05 による細胞内からの K⁺流出の観察

TAMRA および FAM 由来の蛍光をそれぞれ、F₅₈₅、F₅₁₇ として、蛍光レシオ値として、F₅₈₅/F₅₁₇ を求めた。KCl または NaCl の濃度を増加させた時の2つの蛍光色素の強度比から解離定数 K_d を算出した(表2)。PS05 単体に比べ複合体では Na⁺に対する K⁺の選択性が 53 倍から約 240 倍に向上した。この選択性の違いは、Anisotropy 測定から得られた複合体形成前後の蛍光色素対の熱運動性の違いによって説明できた。また、HeLa 細胞に PS05, StAv, B-NES を導入し、アポトーシス誘導剤を添加したときの蛍光イメージングを行った(図6)。

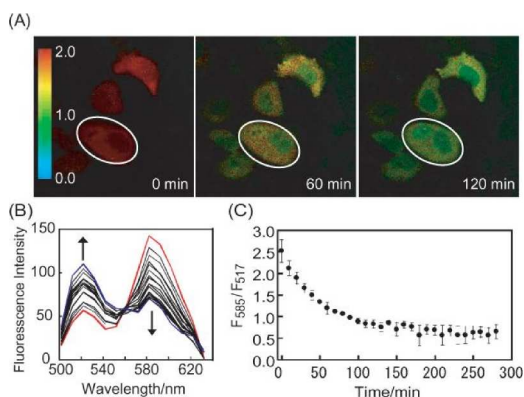


図 6. (A) HeLa 細胞にアポトーシス誘導剤を添加したときの K⁺イメージング画像. (B) (A)のサークル内の蛍光変化. (C) 蛍光レシオ値 F_{585}/F_{517} の時間変化.

アポトーシス誘導剤を添加しないときは、蛍光画像に変化がなかったが、アポトーシス誘導剤を添加すると蛍光変化が観察され、それは FRET によるものであることが分かった。さらに細胞内のカリウムイオン流出は、120 分程度で収束することがわかり、細胞内の K⁺ 流出イメージングに成功した。

以上のように PS05 によって細胞内 K⁺濃度の変化を蛍光イメージングすることに成功した。本プローブが生体内の各種生理機構解明の為の重要なツールとなると期待される。

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 4 件)

(1) Shigeori Takenaka (他 11 名、11 番目) "Fluorescence imaging of potassium ions in living cells using a fluorescent probe based on a thrombin binding aptamer-peptide conjugate、*Chemical Communication*, 48 巻、2012、4740-4742.

(2) Shigeori Takenaka & Bernard Juskowiak、Fluorescence Detection of Potassium Ion Using G-Quadruplex Structure、*Analytical Sciences*、査読有り、27 巻、2011、*Anal. Sci.*, 27, 1167-1172. 注目論文に選定

(3) Shigeori Takenaka (他 4 名、3 番目) Emission lifetime study of fluorescence probes based on G-quadruplex oligonucleotides end-labeled with pyrene moieties、*Spectroscopy*、査読有り、24 巻、2010、325-331.

(4) Shigeori Takenaka (他 3 名、1 番目) DNA Methylation Analysis with an

Intercalator-peptide Conjugate、*Peptide Science* 2009、査読有り、2010、111-112.

[学会発表] (計 20 件)

(1) S. Takenaka (招待講演) (他 7 名、1 番目)、PSO as a fluorometric imaging reagent for an intracellular and extracellular potassium ion、2012 年 11 月 27 日-12 月 1 日、6th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2012)、Shimane Prefectural Convention Center (Kunibiki Messe, 島根)

(2) S. Takenaka (他 7 名、1 番目)、Fluorescence imaging of extracellular potassium ion using DNA-peptide conjugate carrying two fluorescence dyes、2012 年 11 月 15 日-17 日、The 39th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry 第 39 回国際核酸化学シンポジウム、Toyoda Auditorium (名古屋) .

(3) 竹中繁織 (依頼講演)、DNA-ペプチドコンジュゲートを利用したカリウムイオン選択的蛍光試薬の開発と細胞イメージングへの応用、2012 年 11 月 10-11 日、2012 年日本化学会西日本大会、佐賀大学本庄キャンパス (佐賀) .

(4) 竹中繁織 (他 5 名、6 番目)、細胞表面カリウムイオンセンシング試薬 PS0 のコレステロールリンカーの効果、2012 年 9 月 19-21 日、日本分析化学会第 61 年会、金沢大学角間キャンパス (金沢) .

(5) 竹中繁織 (他 7 名、1 番目)、細胞カリウムイオンの蛍光イメージングを目指した G-リッチオリゴヌクレオチド-ペプチドコンジュゲートの合成、2012 年 9 月 6-8 日、第 6 回バイオ関連化学シンポジウム、北海道大学 (札幌) .

(6) S. Takenaka (他 7 名、1 番目)、FLUOROMETRIC IMAGING OF INTERCELLULAR POTASSIUM ION USING A DNA-PEPTIDE CONJUGATE、2012 年 8 月 5 日-9 日、XX IRT-20th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids、Centre Mont-Royal (Montreal, Canada) .

(7) S. Takenaka (他 7 名、1 番目)、Fluorescence imaging of biological potassium using peptide-oligonucleotide conjugate probe、2012 年 7 月 4 日-6 日、第 2 回アジアケミカルバイオロジー会議、サンビーチホテル&リゾート沖縄 (沖縄) .

(8) 竹中繁織 (他 7 名、8 番目)、細胞内外カリウムイオンのペプチド-オリゴヌクレオチドコンジュゲートによる蛍光イメージング、第 49 回化学関連支部合同九州大会、2012 年 6 月 30 日、北九州国際会議場 (福岡) .

(9) 竹中繁織 (他 7 名、8 番目)、細胞間カリウムイオンの蛍光イメージングを目指した DNA-ペプチドコンジュゲートプローブの開発、2012 年 6 月 25 日-26 日、第 22 回バイオ・高分子シンポジウム、東京大学先端科学技術研究センター An 棟 3 階大会議室 (東京) ポスター賞に選ばれました。

(10) 竹中繁織 (他 5 名、6 番目)、ペプチド-オリゴヌクレオチドコンジュゲートによる細胞間カリウムイオンの蛍光イメージング 2012 年 6 月 14 日-16 日、ナノ学会第 10 回大会、大阪大学・大阪大会館 (大阪)。

(11) 竹中繁織 (他 3 名、4 番目)、細胞膜外カリウムイオンイメージング試薬としてのコレステロールを有する G リッチオリゴヌクレオチドの性能評価、2012 年 5 月 19 日-20 日、第 72 回分析化学討論会、鹿児島大学郡元キャンパス (鹿児島)。

(12) 竹中繁織 (他 4 名、5 番目)、生体内カリウムイオンイメージングプローブとしての PS0-5 の性能評価、2012 年 3 月 25 日-28 日、日本化学会第 92 春季年会、慶應義塾大学日吉キャンパス・矢上キャンパス (東京)。

(13) S. Takenaka (他 3 名、4 番目)、Spectral optimization of a DNA-peptide conjugate aiming at potassium ion sensing reagent in an living cell、2011 年 9 月 27 日-29 日、第 48 回ペプチド討論会、札幌コンベンションセンター (札幌)。

(14) 竹中繁織 (他 3 名、4 番目)、細胞間カリウムイオンイメージングのための DNA-ペプチドコンジュゲート試薬の合成、2011 年 9 月 12 日-14 日、第 5 回バイオ関連化学シンポジウム、つくば国際会議場「エポカルつくば」(つくば)。

(15) S. Takenaka (招待講演)、Thrombin Binding Aptamer (TBA) Conjugated with a Peptide Carrying Fluorescent Dyes at Its Termini as a Fluorescent Imaging Reagent of Potassium Ion in the Cell、2011 年 8 月 29 日、The 7th International Symposium BioPhysio Sensor Technology、釜山大学 (韓国釜山)。

(16) S. Takenaka (他 4 名、1 番目)、Fluorescent imaging of potassium ion in the cell using a thrombin binding aptamer (TBA) conjugated with a peptide carrying fluorescent dyes at its termini、2011 年 6 月 28 日-7 月 1 日、Third International Meeting on G-Quadruplex and G-assembly, the Grand Hotel Vesuvio (Sorrento, Italy),

(17) 竹中繁織 (他 3 名、4 番目)、カリウムイオンセンシング試薬としての DNA-ペプチドコンジュゲートの構造最適化、2011 年 3 月 26 日-29 日、日本化学会第 91 春季年会、神奈川大学 横浜キャンパス (横浜)。

(18) S. Takenaka (他 6 名、7 番目)、Thrombin binding aptamer-peptide conjugate for fluorescence imaging of potassium ion in living cells、2010 年 12 月 15-20 日 2010 環太平洋国際化学会議 (PACIFICHEM 2010)、ハワイコンベンションセンター、ワイキキ周辺ホテル (ホノルル、ハワイ)。

(19) 竹中繁織 (他 4 名、5 番目)、オリゴヌクレオチド-ペプチドコンジュゲートの構造変化を利用した細胞内カリウムイオンのイメージング、2010 年 9 月 15-17 日、第 59 回高分子討論会、北海道大学高等教育機能開発総合センター (北海道)。

(20) 竹中繁織 (他 5 名、6 番目)、細胞内カリウムイオンイメージングのためのトロンビン結合アプタマー-ペプチドコンジュゲート、2010 年 3 月 26 日-29 日、日本化学会第 90 春季年会、近畿大学 本部キャンパス (東大阪市)。

[その他]

ホームページ等

<http://takenaka.che.kyutech.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹中 繁織 (TAKENAKA SHIGEORI)

九州工業大学・工学研究院・教授

研究者番号：60188208