

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23350068

研究課題名(和文)ミトコンドリアの動的機能解明のための多機能型二光子励起蛍光プローブの開発

研究課題名(英文) Multifunctional two-photon excitable fluorescence probes for monitoring mitochondria dynamics

研究代表者

川俣 純 (KAWAMATA, JUN)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40214689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円、(間接経費) 4,440,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、(i)二光子励起蛍光効率が高くミトコンドリアの高感度な三次元イメージングが可能、(ii)水溶性が高く、染色に有機溶媒を必要としないため、細胞にダメージを与えず、長時間(1週間以上)のライブセルイメージングが可能、という特徴をもつ新規蛍光プローブを10種類以上開発した。

上記機能に加えて、外部刺激により染色挙動がスイッチングできる蛍光プローブも開発した。具体的には、細胞の活力を表す指標の一つであるミトコンドリアの膜電位の高低を検知し、ミトコンドリアと核との間で染色場所を可逆的に変化させる新規蛍光プローブの開発にも成功した。

研究成果の概要(英文)：Several fluorescence probes for imaging of live mitochondria have been synthesized. These probes exhibited not only salient two-photon excitation fluorescence efficiencies but also high solubility to water. Owing to the high solubility to water of the novel probes, living cells have been stained without using any organic solvent. This advantage of the present probes enabled long time live cell imaging over than one week with a prominent sensitivity.

In addition, we have developed fluorescence probes which switch accumulated organelle by external stimuli. The probes accumulated at mitochondria when the mitochondrial membrane potential was high. As the cell activity decreased the probes moved from mitochondria to nucleus. Reversible change of accumulated organelle has also been confirmed.

研究分野：非線形光学

科研費の分科・細目：機能物質化学

キーワード：非線形光学 二光子吸収 二光子励起蛍光顕微鏡 蛍光プローブ 蛍光イメージング 蛍光

## 1. 研究開始当初の背景

細胞レベルでの生命活動の解析は、生命科学の大きな柱である。特に、ミトコンドリアの研究は、近年のバイオイメージング技術の急速な発展とも相まって、改めて脚光を浴び、活況を呈していた。

ミトコンドリアは、エネルギーを生産するだけでなく、細胞の分化やアポトーシスの制御にも関与している。細胞の癌化、分化、アポトーシスなどのプロセスで、細胞の司令塔である核とミトコンドリアの「動き」がどのように連動し、細胞の運命を決定しているのか、理解することの必要性が高まっていた。

当時、ミトコンドリアの染色には、MitoTracker と呼ばれる主にローダミン系の蛍光プローブが世界中で広く用いられ、生物学・医学に格段の進歩をもたらしていた。しかし、MitoTracker には、(i)細胞に対して毒性のあるジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解させて細胞に投与する、(ii)生細胞内に長時間(30分以上)入れておくこととミトコンドリア以外も染色してしまうなどの問題があり、生きたミトコンドリアの長時間観察に用いることは出来なかった。生きたミトコンドリアの観察には、GFPのような蛍光タンパクでラベルする手法が用いられていた。しかし、分子量が大きい(30,000程度)蛍光タンパクでラベルしたミトコンドリアの「動き」は、ラベルしていないミトコンドリア本来の「動き」とは異なる問題が指摘されていた。

また、細胞内での物質の「動き」を三次元的な空間分解能で明らかに出来る手法として、二光子励起によるイメージング技術の発展が著しいが、MitoTracker や蛍光タンパクの二光子励起の感度は著しく低いため、ミトコンドリアの二光子励起イメージングは進展していなかった。

このような背景の下、ミトコンドリアの研究は、MitoTracker や蛍光タンパクで可視化できる現象の同定に終始する狩猟的なものが一般的であった。最前線の現場からは、ミトコンドリアの「動き」を長時間、ありのままに観察することを可能にする蛍光プローブの開発が化学者に強く要請されていた。

申請者は、従来の研究で、MitoTracker の数倍、蛍光タンパクの100倍にも及ぶ高い二光子吸収効率を示すフルオレン誘導体を開発していた。この化合物は、(a)カチオン性であるためミトコンドリアに膜電位を利用して吸着することが期待できる、(b)水溶性が高いためDMSOに溶解させる必要性のないという特徴を有していたため、細胞内でミトコンドリアだけを選択的に染色し、少なくとも48時間は、細胞を殺さずにミトコンドリアを観察し続けられることを見いだしていた。

## 2. 研究の目的

まず、ミトコンドリアを1週間以上観察し続けることができる蛍光プローブを開発す

る。さらに、長時間の観察のみならず、(i)二光子励起により三次元空間内での動的挙動が解明できる、(ii)外部刺激により蛍光挙動が制御できるというさらに高度な機能を付加した蛍光プローブも開発する。このことにより、これまでのミトコンドリア染色用のプローブではなし得なかったミトコンドリアの動的機能の解明を可能にすることを目指した。

## 3. 研究の方法

(1) 予備研究で見いだした化合物を基盤に、サイズ、形状、価数を系統的に変化させた化合物を設計・合成し、染色実験を行い、細胞内でミトコンドリアだけを選択的に染色することが可能な化合物に必要なとされる分子構造の要件を明らかにする。

(2) 二光子励起による蛍光効率が桁違いに高いプローブを創製する。(1)の研究で得られた知見を活用し、ミトコンドリアへの選択的吸着性を維持しつつ、二光子励起効率を向上させた化合物をデザインする。

(3) 外場の変化でミトコンドリアへの吸脱着が生じるよう、ミトコンドリアへの吸着能が低い化合物を開発する。

## 4. 研究成果

(1) ミトコンドリアに選択的に吸着する水溶性の高い分子の設計指針の構築

まず、予備実験に用いたフルオレン誘導体の構造を基盤に、蛍光性発色団をフルオレン以外のものとした化合物を種々合成・検討した。その結果、ピフェニル、ナフタレン、アントラセン、そしてピレンを導入した化合物が、フルオレンの誘導体と同様に優れたミトコンドリアへの選択的吸着特性と水溶性とを併せ持つことを明らかにした。

また、予備研究に用いたフルオレン誘導体は、分子の両末端にカチオン性部位を持つ化合物であるが、分子の片側のみカチオン性部位を持つ化合物も種々合成・検討した。その結果、フルオレン、ピフェニル、ナフタレンの誘導体では水溶性とミトコンドリアへの選択的吸着特性とを両立できたが、ナフタレンよりも大きな電子共役系をもつ蛍光性発色団を導入すると、水溶性が低くなり、有機溶媒を用いない染色には適さないことがわかった。

以上により、ミトコンドリアに選択的に吸着し、低毒性な蛍光性分子の設計指針を確立することができ、自由度の高い分子設計が可能となった。

(2) 上記(1)で開発した色素の二光子励起蛍光挙動の調査

分子の両末端にカチオン性部位を持つ化合物群は、フルオレン誘導体に匹敵する二光子吸収効率を示すことがわかった。これらの化合物は蛍光量子収率も高く、これまで用いられてきたローダミン類の蛍光プローブと比べ

十分の一以下の弱い励起強度でも二光子励起蛍光イメージングが可能であることを実証した。このことにより、従来よりも飛躍的に高感度な二光子励起蛍光顕微鏡用蛍光プローブを新たに10種類近く開発することができた。

分子の片側にのみカチオン性部位を持つ化合物の中からも、従来の蛍光プローブと比べ5倍以上の二光子吸収断面積をもつ化合物をいくつか見いだすことができた。

### (3)外部刺激によりミトコンドリアへの吸脱着が制御できる色素の開発

上記(1)で開発した化合物のうち、ピフェニル誘導体は、立体障害によりその電子系が平面とはならない。そのため、電子系が完全に同一平面内にある他の化合物と比べ、ミトコンドリアへの吸着能が低いと予測された。そこで、ミトコンドリアの活力の指針の一つである膜電位に摂動を与えるという外部刺激により、ミトコンドリアへの吸脱着の制御を試みた。

ピフェニル誘導体で染色した生細胞に、脱共役剤を添加してミトコンドリアの膜電位を低下させると、ピフェニル誘導体はミトコンドリアを離れ核に移行するという特性を示した。脱共役剤を除去し、ミトコンドリアの膜電位を復活させると、染色場所が核からミトコンドリアへと戻ることも確認できた。同様の分子形状をもつピフェニル誘導体を三種類設計・合成し、膜電位応答性を調査したところ、全ての化合物で同様の応答性が認められた。合成した化合物の中には、従来の蛍光プローブと比べ10倍以上の大きな二光子吸収断面積を示すものもあった。

以上のように、二光子励起蛍光顕微鏡で高感度にミトコンドリアの膜電位モニターが可能であるばかりでなく、膜電位の高低に対応してミトコンドリアと核を行き来するという従来の一光子励起蛍光プローブには無かった機能を有する蛍光プローブを開発することができた。

## 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12件)

- [1] "A Red Fluorescence Two-Photon Absorption Probe for Sensitive Imaging of Live Mitochondria", M. Tominaga, S. Mochida, H. Sugihara, K. Satomi, H. Moritomo, A. Fujii, Y. Suzuki, J. Kawamata, *Chem. Lett.*, in press, 査読有り
- [2] "Two-photon absorption properties of acetylene derivative confined in the interlayer space of a smectite", Y. Suzuki, H. Sugihara, K. Satomi, M. Tominaga, S. Mochida, J. Kawamata, *Appl. Clay Sci.*, DOI: 10.1016/j.clay.2014.01.014, 査読有

り

- [3] "Two-Photon Absorption (TPA) Spectra of Tris(4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline)-metal(II) Perchlorate: Drastic Effects of Central Metal(II) Ions on TPA Cross-Section", H. Moritomo, K. Nakagawa, H. Sugihara, Y. Suzuki, J. Kawamata, *Chem. Lett.*, 2013, 43, 441-443, DOI: 10.1246/cl.131110, 査読有り
- [4] "Fluorescent Nanoparticles of 2-Ethylanthracene and Pyrene", K. Kasatani, M. Kakuichi, Y. Morita, H. Okamoto, Y. Suzuki, J. Kawamata, *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn.*, 2013, 38, 345-348, DOI: 10.14723/tmrj.38.345, 査読有り
- [5] "Third Order Nonlinear Optical Properties of a J-Aggregated Cyanine Dye Intercalated in Saponite", Y. Suzuki, Y. Tenma, Y. Nishioka, M. Tominaga, S. Tani, J. Kawamata, *Clay Science*, 2013, 17, 41-45, 査読有り
- [6] "水溶性高効率二光子吸収化合物の開発", 守友博紀, 鈴木康孝, 川俣純, 月刊「化学工業」, 64(8), 2013, 569-573, 査読無し
- [7] "Incorporation of cationic electron donor of Ni-bridyltetrafulvalene with anionic electron acceptor of polyoxometalate", R. Tsunashima, T. Matsumoto, N. Hoshino, W. Niiho, M. Kimura, K. Kendo, Y. Suyama, Y. Nishioka, J. Kawamata, S. Noro, T. Nakamura, T. Akutagawa, K. Ishiguro, *Dalton Trans.* 41, 2012, 10060, 査読有り
- [8] "Fluorescence Imaging of Mitochondria in Living Cells Using a Novel Fluorene Derivative with a large Two-Photon Absorption Cross-Section", S. Tani, K. Nakagawa, T. Honda, Y. Suzuki, J. Kawamata, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13(14), 2012, 2649, 査読有り
- [9] "A novel Molecular Design Strategy for Efficient Two-Photon Absorption Materials", J. Kawamata, Y. Suzuki, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13(14), 2012, 2569, 査読有り
- [10] "Efficient Nonlinear Optical Properties of Dyes Confined in Interlayer Nanospaces of Clay Minerals", Y. Suzuki, Y. Tenma, Y. Nishioka, J. Kawamata, *Chem Asian J.*, 7(6), 2012, 1170-1179, 査読有り
- [11] "Fluorescent organic nanoparticles", K. Kasatani, Y. Fujikake, Y. Morita, H. Okamoto, Y. Suzuki, J. Kawamata, *Transactions of the Materials Research Society of Japan*, 36 (3), 2011, 421-424, 査読有り
- [12] "Efficient Two-Photon Absorption

Materials Consisting of Cationic Dyes and Clay Minerals", Y. Suzuki, Y. Tenma, Y. Nishioka, K. Kamada, K. Ohta, J. Kawamata, *J. Phys. Chem. C*, 115, 2011, 20653-20661, 査読有り

〔学会発表〕(計30件)

- [1] "生細胞の二光子励起蛍光イメージングのための赤色発光を示すピレン誘導体", 守友博紀、杉原寛之、里見浩一郎、藤井旺成、仁子陽輔、小西玄一、鈴木康孝、川俣純、日本化学会第94春季年会 名古屋大学(名古屋市)、2014年3月28日
- [2] "ベンゾチエニルピリジンと $\beta$ -ジケトン誘導体を配位子とするイリジウム錯体の二光子吸収特性", 藤井旺成、守友博紀、里見浩一郎、鈴木康孝、川俣純、日本化学会第94春季年会 名古屋大学(名古屋市)、2014年3月27日
- [3] "二光子励起蛍光顕微鏡による生細胞の観察", 守友博紀、山田健悟、藤井旺成、杉原寛之、里見浩一郎、谷誠治、鈴木康孝、川俣純、物質構造解析研究会第6回討論会 山口大学(山口市)、2014年2月28日
- [4] "近赤外発光型高効率二光子励起蛍光化合物を用いた生細胞イメージング", 川俣純、鈴木康孝、第10回バイオオプティクス研究会 東京農工大学(小金井市)、2013年12月6日【招待講演】
- [5] "ルテニウム( )錯体の光第二高調波発生円偏光二色性応答", 杉原寛之、持田修平、鈴木康孝、谷誠治、川俣純、錯体化学第63回討論会 琉球大学(西原町)、2013年11月2日
- [6] "Ru( )錯体を用いた生細胞の二光子励起蛍光イメージング", 守友博紀、藤井旺成、鈴木康孝、川俣純、錯体化学第63回討論会 琉球大学(西原町)、2013年11月2日
- [7] "Two-photon absorption characteristics and cell imaging of novel styryl derivatives", H. Moritomo, A. Tomoyuki, Y. Suzuki, J. Kawamata, "International Symposium for the 70th Anniversary of the Tohoku Branch of the Chemical Society of Japan" (Tohoku University, Sendai, Japan), 2013年9月29日
- [8] "Two photon absorption property of a novel quinacridone derivative", H. Sugihara, M. Tominaga, K. Satomi, S. Tani, Y. Suzuki, J. Kawamata, T. Takeda, T. Akutagawa, "International Symposium for the 70th Anniversary of the Tohoku Branch of the Chemical Society of Japan" (Tohoku University, Sendai, Japan), 2013年9月28日
- [9] "スチルベン系高効率二光子励起蛍光プローブによるミトコンドリアの長時間イメージング", 守友博紀、鈴木康孝、谷誠治、川俣純、2013年光化学討論会 愛媛大学(松山市)、2013年9月13日
- [10] "フルオレン系高効率二光子励起蛍光プローブによる生細胞の二光子励起蛍光イメージング", 守友博紀、鈴木康孝、谷誠治、川俣純、日本化学会「低次元系光機能材料研究会」第2回サマーセミナー にぎたつ会館(松山市)、2013年9月9日
- [11] "ジシアノメチレン基を導入したキナクリドン誘導体の二光子吸収特性", 杉原寛之、富永亮、里見浩一郎、谷誠治、鈴木康孝、川俣純、武田貴志、芥川智行、日本化学会「低次元系光機能材料研究会」第2回サマーセミナー にぎたつ会館(松山市)、2013年9月9日
- [12] "ミトコンドリア可視化機能を有するピフェニル誘導体の耐光性の向上", 山田健悟、守友博紀、持田修平、鈴木康孝、谷誠治、川俣純、日本化学会「低次元系光機能材料研究会」第2回サマーセミナー にぎたつ会館(松山市)、2013年9月9日
- [13] "ジシアノメチレン基が置換したキナクリドン誘導体の構造と光物性", 武田貴志、杉原寛之、富永亮、鈴木康孝、川俣純、芥川智之、第24回基礎有機化学討論会 学習院大学(東京都豊島区)2013年9月5日-7日
- [14] "Molecular Structure and Photophysical Properties of Quinacridone and Acridone Based Electron Acceptors", T. Takeda, M. Tominaga, Y. Suzuki, J. Kawamata, T. Akutagawa, "15th International Symposium on Novel Aromatic Compounds" (Howard Civil Service International House, Taipei, Taiwan) 2013年7月28日-8月2日
- [15] "A Novel Two-photon Excitable Fluorescence Probe for Monitoring Mitochondrial Membrane Potential", H. Moritomo, K. Yamada, Y. Suzuki, S. Tani, J. Kawamata, "International Conference on Photochemistry" (K. U. Leuven, Leuven, Belgium) 2013年7月22日、23日
- [16] "ピフェニル系高効率二光子励起蛍光プローブによるミトコンドリアの膜電位のモニタリング", 守友博紀、山田健悟、藤井駿介、鈴木康孝、谷誠治、川俣純、「日本化学会第93春季年会」立命館大学(草津市)、2013年3月24日
- [17] "Nonlinear Optical Properties of Organic Material", J. Kawamata, "International Conference of Material Science 2013", アガルタラ (インド)、2013年2月23日【招待講演】
- [18] "二光子吸収断面積の大きなピフェニル誘導体によるミトコンドリア内膜の膜電位のモニター", 守友博紀、山田健悟、

- 藤井駿介、鈴木康孝、谷誠治、川俣純、  
「第9回バイオオプティクス研究会」  
山口大学(山口市)、2012年12月7日
- [19] “光誘起による高効率二光子蛍光プローブのミトコンドリアからの脱離”、山田健悟、守友博紀、鈴木康孝、谷誠治、川俣純、「第9回バイオオプティクス研究会」山口大学(山口市)、2012年12月7日
- [20] “スキャンブロックを用いた二光子励起蛍光イメージング”、川俣純、「第9回バイオオプティクス研究会」山口大学(山口市)、2012年12月7日【招待講演】
- [21] “水溶性スチルバゾリウム誘導体による生細胞の染色”、守友博紀、山田健悟、藤井駿介、鈴木康孝、谷誠治、川俣純、「第2回CSJ化学フェスタ2012」東京工業大学(東京都目黒区)、2012年10月17日
- [22] "Spectroscopic Properties of a Solvatochromic Dye on a Clay Surface", H. Matsuo, S. Mochida, Y. Nishioka, Y. Suzuki, S. Tani, J. Kawamata, "The 2nd Asian Clay Conference", (Ewha Women's University, Seoul, Korea) 2012年9月7日
- [23] 蛍光性ピフェニル誘導体の二光子吸収特性とミトコンドリア染色挙動、山田健悟、天満悠太、嘉原理仁、谷誠治、川俣純、日本化学会第92春季年会 慶應義塾大学(横浜市)、2012年3月27日
- [24] 細胞ダイナミクスの可視化機能を有するピフェニル誘導体の分光学的性質、山田健悟、天満悠太、嘉原理仁、本田拓也、谷誠治、川俣純、山口大学理学部第12回講演会「システム設計に基づく有機分子の機能化：光・電子・生命機能への新展開」山口大学(山口市)、2012年1月17日
- [25] 高効率三次非線形光学材料の創製を目指したシアニン系色素J会合体の粘土ナノシート層間への固定、天満悠太、西岡幸泰、鈴木康孝、川俣純、山口大学理学部第12回講演会「システム設計に基づく有機分子の機能化：光・電子・生命機能への新展開」山口大学(山口市)、2012年1月17日
- [26] 新規なフルオレン系およびピフェニル系蛍光色素の細胞染色挙動、谷誠治、本田拓也、嘉原理仁、山田健悟、天満悠太、川俣純 第8回バイオオプティクス研究会 北里大学(相模原市) 2011年12月17日【招待講演】
- [27] 有機ナノ粒子及びポリマー被覆膜中の色素の二光子吸収断面積、角一正樹、藤野崇人、高最宏幸、笠谷和男、森田由紀、川俣純、MRS-J山口大学支部大会 山口大学(宇部市)、2011年11月26日
- [28] 粘土表面でJ会合体を形成する有機色素からの非線形光学応答、天満悠太、西岡幸泰、鈴木康孝、川俣純、第55回粘

土科学討論会 鹿児島大学(鹿児島市)  
2011年9月15日

- [29] "Spectroscopic Properties of a Piezochromic Bianthrone Derivative Ion-Exchanged with a Clay Mineral", Y. Nishioka, Y. Tenma, Y. Suzuki, J. Kawamata, "EUROCLAY 2011", (Antalya, Turkey) 2011年6月30日
- [30] "Enhanced Two-Photon Absorption Cross-Sections of Composites Consisting of Cation Dyes and Synthetic Saponite", J. Kawamata, Y. Suzuki, Y. Tenma, Y. Nishioka, "EUROCLAY 2011", (Antalya, Turkey) 2011年6月30日

〔図書〕(計 1件)

- [1] 鈴木康孝、川俣純、「水溶性二光子吸収化合物」、渡辺敏行 監修 『高効率二光子吸収材料の開発と応用』、第3章、第2節、(pp. 40-51)シーエムシー出版、2011年9月

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称：二光子吸収化合物  
発明者：鈴木康孝、川俣純、守友博紀、富永亮、小西玄一、仁子洋輔  
権利者：国立大学法人山口大学  
種類：特許  
番号：特願 2014-47329  
出願年月日：2014年3月11日  
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  
<http://web.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~solid/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川俣 純 (KAWAMATA JUN)  
山口大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：40214689

### (2) 研究分担者

鈴木 康孝 (SUZUKI YASUTAKA)  
山口大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：30634753

(3)連携研究者  
なし