

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年4月22日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23651238

研究課題名（和文）細胞内クロライドアニオンを可視化する蛍光プローブ分子の開発

研究課題名（英文）Development of Fluorescent Probe for Visualization of Intracellular Chloride Anion

研究代表者

王子田 彰夫 (OJIDA AKIO)

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号：10343328

研究成果の概要（和文）：本研究では、アクリジニウムアミド構造を有する新しいタイプのクロライドアニオン蛍光プローブの開発を行った。この蛍光プローブは、衝突消光のセンシングメカニズムにより、クロライドアニオンに対してシグナル OFF 型の蛍光応答を示す。また、生体と同程度の 1 mM から百 mM 程度のクロライドアニオンを検出することが可能であった。開発したアクリジニウムアミド型のプローブのセンシング特性を利用して、HEK293 細胞内のクロライドアニオンをバイオイメージングにより可視化することに成功した。また、本研究では、細胞膜透過性のアクリジニウムアミド型プローブの開発にも成功した。この膜透過性プローブは今後、細胞内クロライドイオンの機能を解析するための新しい分子ツールとして有用であると期待できる。

研究成果の概要（英文）：We have developed a new acridinium amide-type fluorescent sensor for chloride anion. This probe showed a large fluorescent-off signal in response to chloride anion based on the collisional quenching mechanism in the biological relevant concentration range (from 1 mM to 100 mM). Taking advantage of the sensing ability, we successfully applied this probe to the fluorescent bioimaging of intracellular chloride anion in living HEK293 cells. We have also developed another type of acridinium amide probe that can penetrate cell membrane, which we expect would be a valuable molecular tool for analysis of biological roles of chloride anion.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：クロライドイオン、蛍光プローブ、バイオイメージング、細胞機能

1. 研究開始当初の背景

クロライドイオン(Cl⁻)は、神経細胞におけるシグナル伝達をはじめ、細胞内 pH や細胞体積の制御、液分泌、膜電位の安定化など様々な生体機能の発現・維持に重要な役割を果たしている。これらの機能発現には、細胞内クロライドイオン濃度[Cl⁻]_iの制御された

変動や維持が重要であり、実際に[Cl⁻]_iは細胞膜上に存在するクロライドイオン選択的なチャネル(CIC)やトランスポータータンパク質により厳密なコントロールを受けている。しかしながら、このような[Cl⁻]_iを制御するチャネルやトランスポーターなどの分子実態がすでに明らかにされているにも関わらず、ク

クロライドイオン濃度制御の詳細なメカニズムは未だに十分な解明がなされていない。この原因の一つは、生細胞におけるクロライドイオンの濃度変動を感度よく簡便に検出できる分析手法の開発が不十分であるためである。これまでにクロライドイオンに対する蛍光プローブの開発が行われている。しかしながら、その報告数は極めて限られており、開発は大きく立ち遅れている現状にある。実用的に細胞研究に有用なクロライド蛍光センサー分子は、ほぼ唯一、SPQなどのキノリニウム塩誘導体である。SPQは、クロライドイオンとの衝突消光により、数 mM から 100 mM 程度のクロライドアニオンを検出することが可能である。しかしながら、SPQは、1) 蛍光減衰シグナルによる検出であるため蛍光上昇型に比べ感度が劣る、2) 短波長励起($\lambda_{ex} < 370 \text{ nm}$)であるため細胞にダメージを与えやすい、3) 励起波長における吸光係数が小さいため ($\epsilon = 5,000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) 蛍光が暗い、などの機能的な問題を有している。一方、lucigenin がクロライドイオンに対するシグナル減衰型の蛍光プローブとして開発されているが、励起光による消光が激しく、実用において大きな問題を抱えている。申請者は、このような背景の下、細胞内クロライドイオンを高感度かつ定量的に蛍光検出可能な新しい蛍光プローブ分子を開発することを着想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞内のクロライドアニオンを蛍光検出可能な新しいプローブ分子の開発である。本研究では、新たな分子デザインに基づいてクロライドイオンに対する蛍光プローブ分子を開発することにより、これまで未解明であった細胞内クロライドイオンの濃度制御メカニズムの解明に貢献できる新しい分子ツールの創製を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、細胞内クロライドイオンを高感度かつ定量的に検出することを目指して、(1) 長波長励起型の新しい蛍光プローブ分子の探索、(2) 新しいセンシング機構に基づく二波長レシオ型の蛍光プローブ分子の開発、の二つの戦略に基づいて研究を進めた。(1) については、クロライドイオンとの衝突消光をセンシング機構として有する新しい長波長励起、長波長発光型の蛍光プローブを探索した。(2) においては、二種類の異なる光誘起電子移動(PeT)の競合を利用した新しいクロライドアニオンの検出機構を確立し、二波長レシオ型の蛍光プローブ分子の開発を目指した。開発したプローブ分子は、クロライドアニオンに対するセンシング能を *in vitro* にて基礎評価した後に、細胞系でのイメージングにより評価を行った。

4. 研究成果

研究戦略(1)についての成果：当初は、まずクロライドアニオンを衝突消光型の蛍光応答でセンシングできる新しい蛍光化合物のスクリーニングを行った。20種類以上の化合物の機能検討の結果、アクリジニウムアミド型の化合物 **1** がクロライドイオンに対して良好な蛍光減衰型のセンシング能を持つことを見出した(図1)。

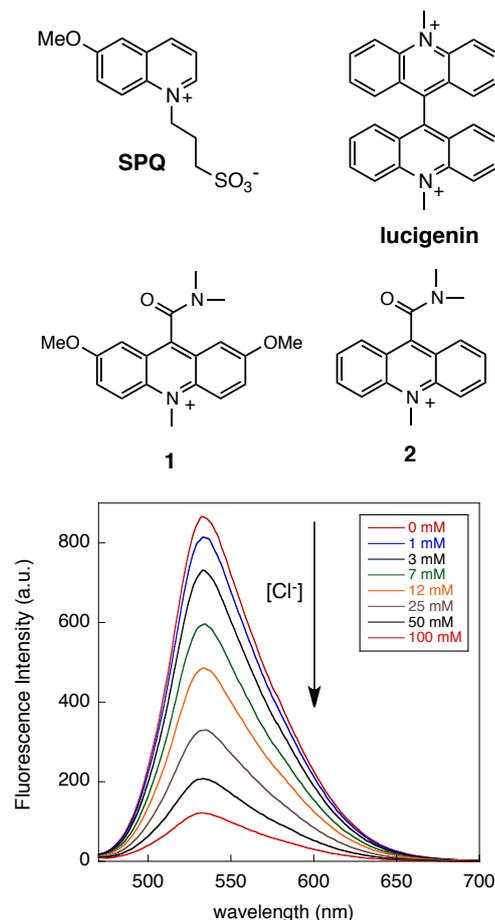


図 1. 蛍光プローブ **1** によるクロライドアニオンの蛍光センシング

蛍光滴定より得られた **1** のクロライドイオンに対する K_{sv} 値 (Stern-Volmer 定数) は 59.5 M^{-1} であった。このセンシング能は、従来の SPQ やルシゲニンよりもやや低いものの、細胞内クロライドイオンの濃度範囲 (数 mM ~ 100 mM) である 16.8 mM で蛍光強度が半減する十分なセンシング感度を維持していた。また **1** は、アクリジニウム環の 2、7 位にメトキシ基を持たない化合物 **2** に比べて、より長波長の吸収極大 ($\lambda_{max} = 398 \text{ nm}$) を持ち、量子収率 ($\Phi = 0.38$) も比較的高く、蛍光プローブとして優れた特性を有している事を明らかとなった。

次にアクリジニウムアミド **1** の光安定性について評価を行った。評価は、化合物をシリカゲルに吸着させ、蛍光顕微鏡下での励起光照射により光退色の程度を観察する事により行った。結果を図 2 に示す。従来から光安定性が低いことで知られているルシゲニンは、光照射 10 分後にほぼ蛍光を失う強い光退色性を持つことが明らかとなった。一方で、今回新たに見出した **1** の光安定性は SPQ と比較するとやや劣るもののルシゲニンよりはるかに高く、光照射後 20 分後においても 6 割程度の蛍光強度を維持していた。興味あることにアクリジニウム環の 2、7 位にメトキシ基を持たない **2** の光安定性はルシゲニンと同程度の光安定性を示さなかった。したがって **1** はメトキシ基導入により高い光安定性を獲得していることが明らかとなった。この光安定性については、おそらく電子供与性のメトキシ基を導入することによりアクリジニウム環の電子欠損状態が緩和され、光励起時において溶媒である水分子などによる求核攻撃を受けにくくなったためであると推測できる。

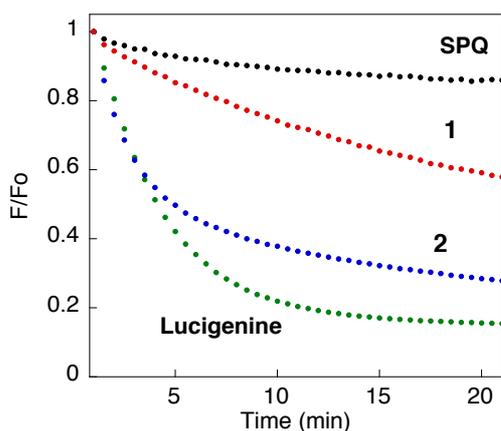


図 2. 各蛍光プローブの光安定性評価

さらに本研究では、アクリジニウムアミドを用いた細胞内クロライドイオンの蛍光センシングの検討を行った (図 3)。グリシン受容体を発現させた HEK293 細胞に本化合物を導入後、細胞に対してグリシンを作用させると、細胞内へのクロライドイオンの流入に伴う蛍光強度の一過的な減少が観察された。一方、グリシン受容体のアンタゴニストであるストリキニーネ存在下では、グリシン刺激による蛍光強度の減少は観察されなかった。この事より、新たに見出したアクリジニウムアミド化合物は細胞内でクロライドアニオンの濃度変化を検出できる蛍光プローブとして機能することを明らかとした。

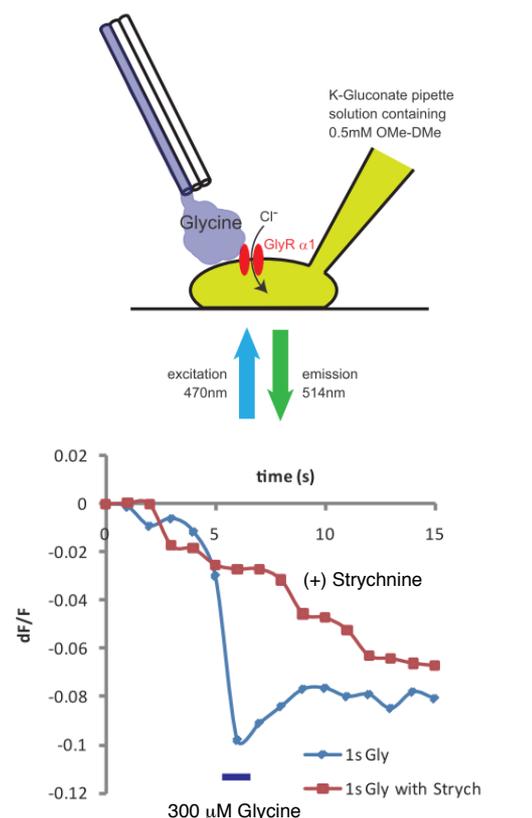


図 3. 蛍光プローブ **1** による HEK293 細胞内クロライドイオン濃度変化の蛍光センシング

蛍光プローブ **1** は、従来のクロライドアニオン蛍光プローブと比べて優れたセンシング特性を持つが、一つの問題点は、本化合物が細胞膜非透過性であることであった。そのため、上記の細胞でのバイオイメージングにおいては、パッチクランプを用いて **1** を細胞内へと導入しなくてはならなかった。この点を改善するため、**1** に対して膜透過性を高める構造変換を行なった。その結果、脂溶性の Fmoc (9-fluorenylmethylloxycarbonyl) 基が **1** の膜移行に有効である新たな知見を得た (図 4)。すなわち、**1** の持つアクリジニウムアミド構造にジスルフィド結合を介して Fmoc 基を有する **3** は、HeLa 細胞や HEK 293 細胞の膜を透過し細胞質に移行するが、細胞質中では高濃度のグルタチオンの作用によりジスルフィド結合が還元されフリーシステイン型の **4** となる。**4** は、水溶性が高いため再び膜透過性を失い細胞内に貯留する。実際に **3** を試験管内にて 10 mM のグルタチオンで処理すると 5 分以内に **4** へ完全に変換されることが確認された。また、系中にて生じた **4** は **1** とほぼ同程度のクロライドアニオンに対する蛍光センシング能を有することが確認された。今後、膜透過性プローブ **3** を用いて細胞内クロライドイオンの可視化解析を進めて行く予定である。

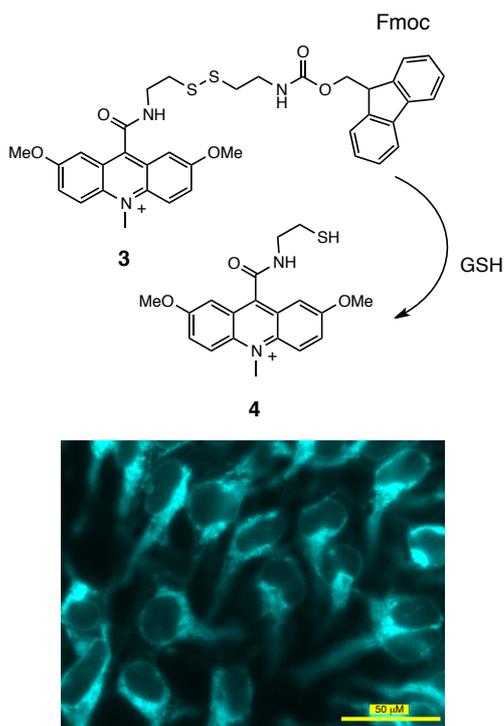


図4. 蛍光プローブ3のHEK293細胞内への膜移行性の確認

研究戦略(2)についての成果：二波長レシオ型の蛍光プローブ開発については、これまでに5あるいは6の様ないくつかの蛍光プローブをデザインして合成、機能について評価を行った。しかしながら、得られたプローブは蛍光を発しない、あるいは蛍光は発するがクロライドアニオンに対する蛍光応答性が悪いなどの結果にとどまり望む成果を得るには至っていない。

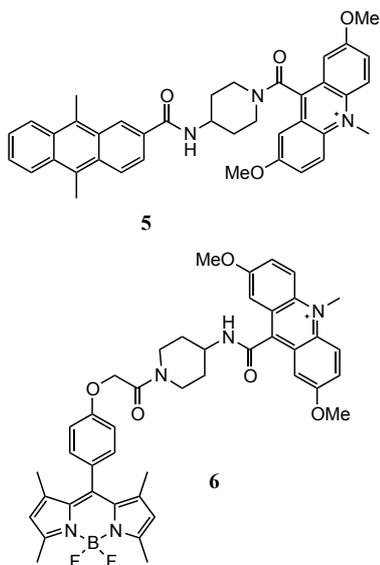


図5. 合成を行った二波長レシオ変化型クロライドアニオン蛍光プローブ

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0件)

〔学会発表〕(計4件)

熊手 彩音、押川 裕二、中園 学、王子田 彰夫、生体内クロライドアニオンを検出する新規蛍光プローブの開発、日本化学会第92春季年会、2012, 3, 26.

熊手彩音、押川祐二、中園学、江頭良明、高森茂雄、王子田彰夫、生体内クロライドアニオンを検出する新規蛍光プローブの開発、第49回化学関連支部合同九州大会、2012, 6, 30.

Ayane Kumade, Yuji Oshikawa, Yoshihiro Egashira, Shigeo Takamori, Akio Ojida, Development of Fluorescent Probe for Chloride Anion in Cell, The 5th Japan-Korea Joint Symposium on Bio-microsensing Technology, 2012, 10, 26.

熊手彩音、押川祐二、江頭良明、高森茂雄、王子田彰夫、生体内クロライドアニオンを検出する新規蛍光プローブの開発、日本化学会第93春季年会、2013, 3, 23.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

王子田 彰夫 (OJIDA AKIO)

九州大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：10342228

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：