

# 論文の内容の要旨

## 論文題目

### リソソーム内 pH を定量可能な レシオ型蛍光プローブの開発

氏名 溝口 舞

#### 【背景・目的】

細胞内の各オルガネラは固有のpHを持つことで様々な生化学反応を制御している。そのため、pHはこうした生化学反応を効率良く進行させるために重要な役割を担っている。リソソームは直径約0.1~0.8  $\mu\text{m}$ の一重膜で囲まれた袋状のオルガネラで、様々な加水分解酵素を含んでおり、エンドサイトーシスによって取り込まれた物質の分解やリサイクルが主な役割である。エンドサイトーシス経路では、初期エンドソームからリソソームへと成熟するに伴い内部のpHが酸性化する。これまでリソソーム内pHのレシオイメージングは、pHに依存した吸収波長の変化を示す緑色蛍光色素フルオレセインをdextranに標識したプローブが用いられてきたが<sup>1)</sup>、フルオレセインは酸性条件下での蛍光強度が小さいことや光褪色に弱いという問題点があった。一方、近年当研究室にて開発されたレシオ型pHプローブSiRpH6.1は<sup>2)</sup>、光褪色に強く長時間のレシオイメージングが可能であると共に、励起・蛍光波長が長いことからGFPやYFPなどの緑色や黄色蛍光タンパク質との共染色が可能であった(Figure 1)。しかしながら、レシオ値変化の $\text{p}K_a$ が6.1であり、初期エンドソーム等の酸性度の低い小胞のpH測定には適していたが、酸性度の高いリソソームの測定には適していなかった(Figure 2a)。そこで、リソソーム内のpH測定に適した $\text{p}K_a$ を持つレシオ型蛍光プローブを開発することで、

リソソーム内pH  
とその機能の関  
係を明らかにす  
ることを目指し  
た。

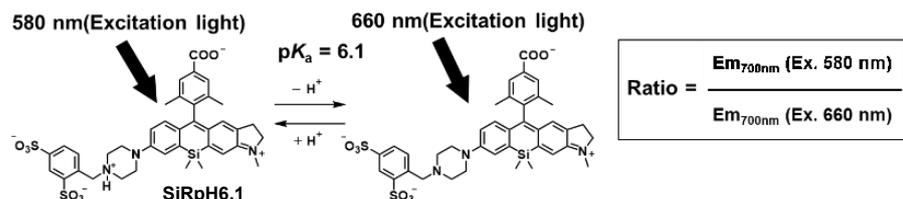
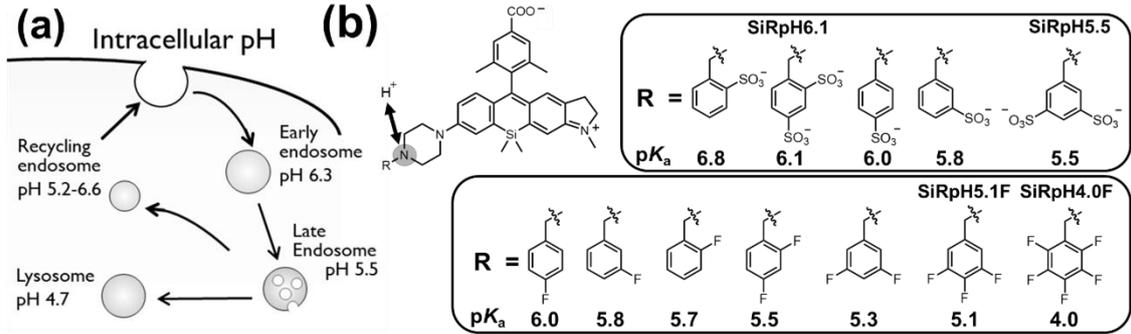


Figure 1. Structure of a ratiometric pH fluorescent probe, SiRpH6.1.

**【方法・結果】**

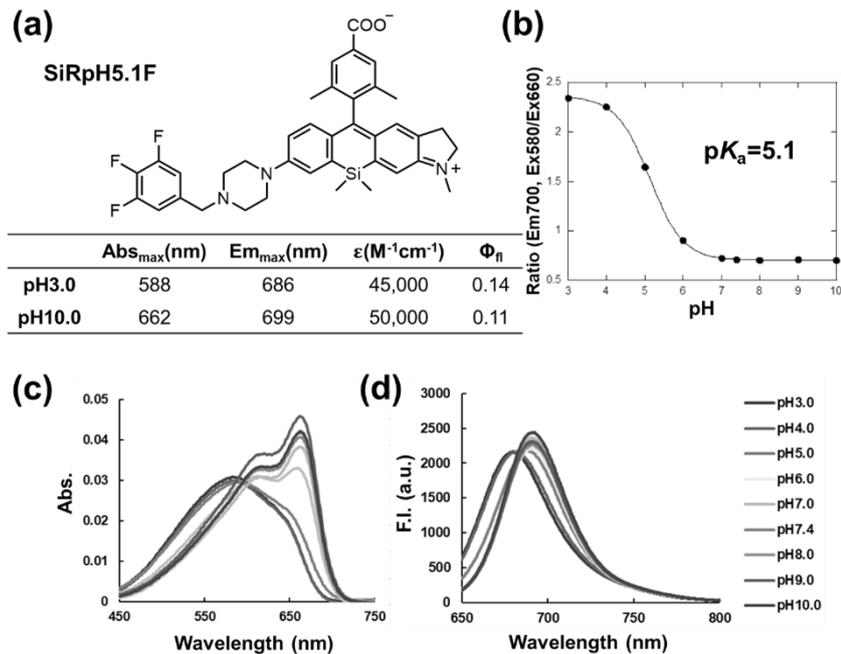
**1. リソソーム内 pH の定量に適した pK<sub>a</sub> を持つ蛍光プローブの開発**

まず、当研究室でこれまでに開発された SiRpH6.1 を母核に、リソソーム内 pH の定量に適したレシオ型蛍光プローブの開発を行った。具体的には、SiRpH6.1 の分子構造にあるピペラジニアミノ基に結合したベンジル基に、スルホ基またはフルオロ基を様々な置換位置に導入することで、pK<sub>a</sub>を下げることを行った(Figure 2b)。



**Figure 2.** (a) pH values in different subcellular compartments. (b) pK<sub>a</sub> values of synthesized SiRpH probes.

これらプローブ群の光学特性を調べた結果(Figure 2)、スルホ基では到達できなかった pK<sub>a</sub> = 5.1 を示す pH プローブである SiRpH5.1F の開発に成功した(Figure 3a,b)。開発した蛍光プローブは、塩基性から酸性への変化に応答して吸収波長が 662 nm から 588 nm と約 80 nm もの短波長化を示したが、一方で、蛍光波長は大きな変化は示さず、蛍光量子収率は何れの条件においても 10% 以上の高い蛍光輝度を示したことからレシオ蛍光イメージングに適した光学特性であった(Figure 3a, c, d)。

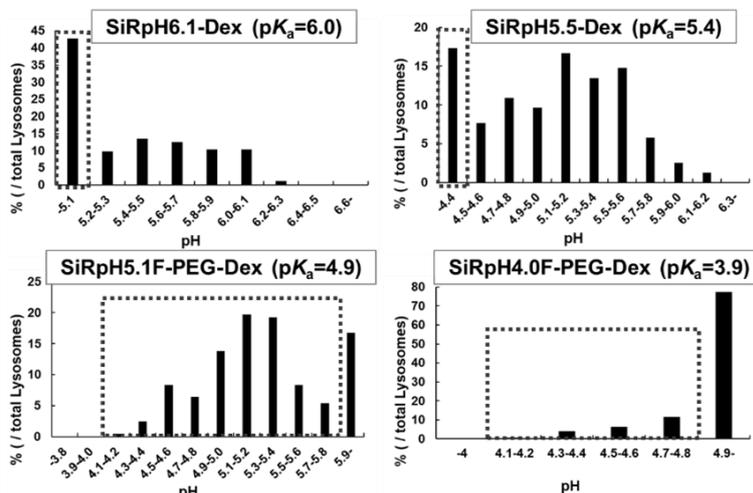


**Figure 3.** (a) Photophysical properties of SiRpH5.1F. (b) Plot of ratio values vs pH. (c) Absorbance and (d) fluorescence spectra (Ex = 600 nm).

さらに、フルオロ基を増やすことで、pK<sub>a</sub>=4.0 をもつ SiRpH4.0F の開発にも成功した(Figure 2)。次に pK<sub>a</sub> = 5.1 を示す SiRpH5.1F を用いて、プローブを細胞内リソソームへと導入することを試みた。具体的には、本プローブをポリエチレングリコール(PEG)リンカーを挟み、分子量 10 kDa の dextran に標識することで、エンドサイトーシスによって細胞内リソソームへとプローブを送達させることに成功した。

## 2. リソソーム内 pH 測定に適したプローブの検討

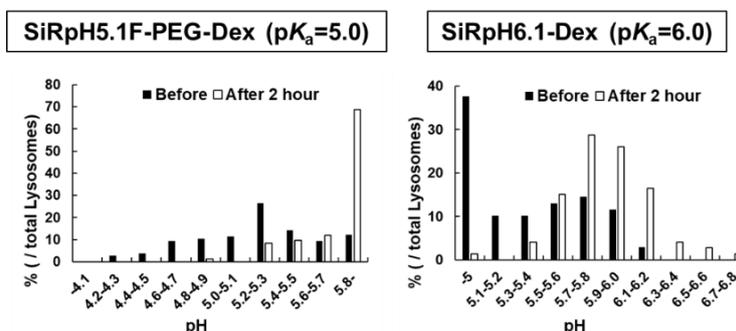
次に、前項で開発したプローブ群の中から、実際にリソソーム内 pH の定量に適したプローブを検討することとした。SiRpH6.1-Dex ( $pK_a = 6.1$ ; Figure 1)、SiRpH5.5-Dex ( $pK_a = 5.5$ ; Figure 2)、SiRpH5.1F-PEG-Dex ( $pK_a = 5.1$ ; Figure 2)及び SiRpH4.0F-PEG-Dex ( $pK_a = 4.0$ ; Figure 2)の 4 つの  $pK_a$  が異なる蛍光プローブを用いて、リソソーム内 pH の定量を行った (Figure 4)。具体的には、リソソームのマーカー蛋白質の一つである Lamp1(GFP 融合)を安定発現させた MEF 細胞に、各プローブを標識した dextran を導入し、GFP の蛍光と蛍光プローブの蛍光が一致したリソソームを 10 細胞から選び出し、pH の定量を行った。その結果、SiRpH5.1F-PEG-Dex が、リソソームの pH 測定に最も適した蛍光プローブであることが分かった。



**Figure 4.** pH distribution of lysosomes measured with SiRpH6.1-Dex, SiRpH5.5-Dex, SiRpH5.1F-PEG-Dex or SiRpH4.0F-PEG-Dex. Number of lysosomes: SiRpH6.1-Dex = 185, SiRpH5.5-Dex = 155, SiRpH5.1F-PEG-Dex = 205, SiRpH4.0F-PEG-Dex = 173.

## 3. 薬剤によるリソソーム内の pH 変化のイメージング

本項では、Lamp1-GFP 安定発現 MEF 細胞を用いて、V-ATPase 阻害剤である bafilomycin A1 の添加前後におけるリソソーム内 pH の変化について測定を行った。Bafilomycin A1 は液胞型プロトンポンプを特異的に阻害するため、リソソーム内 pH の上昇が起こると考えられるが、pH 分布がどこまで変化するかは調べられていなかった。そこで、SiRpH5.1F-PEG-Dex 及び SiRpH6.1-Dex を用いて bafilomycin A1 の添加による pH 分布の変化を調べた。その結果、SiRpH5.1F-PEG-Dex では bafilomycin A1 の添加前のリソソームの pH 分布が観察可能であったが、添加後のリソソーム内 pH は 5.8 以上の測定範囲外のものも多く、添加後のリソソーム内 pH の分布を測定することができなかった。一方、SiRpH6.1-Dex を用いることで、bafilomycin A1 の添加後の pH 分布を観察可能であった (Figure 5)。このように、 $pK_a$  の異なる pH プローブを用いることで、bafilomycin A1

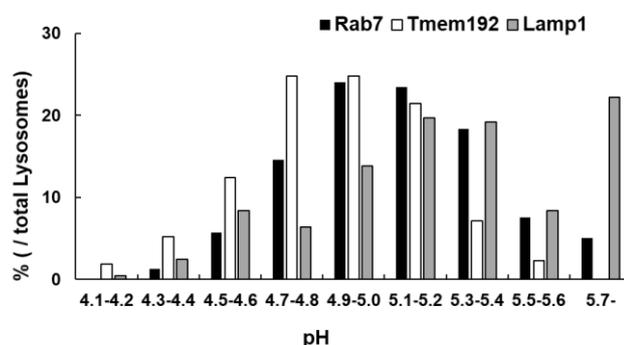


**Figure 5.** SiRpH5.1F-PEG-Dex : Number of lysosomes; Before=106, After=83. SiRpH6.1-Dex : Number of lysosomes; Before=69, After=73. pH distribution of lysosomes measured with SiRpH5.1F-PEG-Dex or SiRpH6.1-Dex before and after addition of bafilomycin A1.

の添加によってリソソーム内の平均 pH が 5.2 から 5.9 に中性化することを明らかにした。

#### 4. リソソームマーカー蛋白質の評価

これまで本研究において、Lamp1-GFP 蛍光を指標にリソソーム内の pH 測定を行ってきた。しかし、Lamp1-GFP を過剰発現させた場合、必ずしもリソソームの局在と一致しないとの報告があり<sup>3)</sup>、リソソームマーカー蛋白質の過剰発現がリソソーム内 pH 及び機能に影響を与える可能性が考えられた。そこで、他のリソソームマーカー蛋白質として Rab7 と Tmem192 を選択し、Rab7-GFP と Tmem192-GFP の安定発現 MEF 細胞を用いて、リソソーム内の pH 分布の測定を行った。SiRph5.1-PEG-Dex を生細胞へと添加し、ランダムに一細胞当たりリソソームを 10 個ずつピックアップし、その pH 分布を測定した。その結果、Lamp1-EGFP の局在するリソソームの pH 分布において 5.7 以上の pH の高いリソソームが多数観察された一方、Rab7 及び Tmem192 では、pH4.0~5.7 にほぼ全てのリソソームが分布しており、Lamp1-GFP を用いた際に観察された 5.7 以上の pH の高いリソソームは殆ど観察されなかった。したがって、汎用される Lamp 1-EGFP の過剰発現により、リソソーム内 pH が中性化され、それら機能に影響を与えていることが考えられた。このように、pH を指標としてマーカー蛋白質のリソソーム機能への影響を評価することに成功した。



**Figure 6.** pH distribution of lysosomes measured with SiRph5.1F-PEG-Dex. 10~30 lysosomes (or late endosomes)  $\times$  10 cells were picked up and their pH values were calculated. Number of lysosomes; Rab7 = 158, Tmem192 = 266, Lamp1 = 205.

#### 【総括・今後の展望】

本研究において、SiRph6.1 のベンジル基上にフルオロ基を導入することで、酸性度の高いリソソームにおいて pH を定量可能なレシオ型蛍光プローブ、SiRph5.1F-PEG-Dex の開発に成功した。また、開発した pH プローブを用いることで、リソソーム内 pH の定量や阻害剤の添加によるリソソーム内 pH の変化、及びマーカー蛋白質の過剰発現によるリソソーム内 pH への影響を可視化することに成功した。これまでにリソソーム内 pH の測定に最適化されたレシオ型 pH 蛍光プローブは殆どなく、今後はオートファジーやリソソームの機能不全を示すリソソーム病等の疾患において、リソソーム内 pH とそれら機能との関係について明らかにしていきたい。

[参考文献] 1) S. Ohkuma et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 3327-3331 (1978); 2) S. Takahashi et al., *J. Am. Chem. Soc.* 140, 5925-5933 (2018). 3) D. M. Sabatini et al., *Science* 10, 807-813 (2017).