

# 博士論文(要約)

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

溝口 舞

## 【背景】

細胞内では、複雑な生化学反応が時空間的に制御されることで生命が維持されており、細胞内コンパートメントは、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。オルガネラは脂質膜により、互いに分離され固有の pH 環境を形成しているが、これら pH は各コンパートメント内での生化学反応に対して最適な環境を作り出している。リソソームは、直径約 0.1~0.8  $\mu\text{m}$  の一重の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の一つである。エンドサイトーシス経路では初期エンドソームから後期エンドソーム、及びリソソームまで成熟することでその内部の pH が酸性化されていく。これまでリソソーム内 pH のレシオ蛍光イメージングにおいては 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 などの緑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  $\text{pK}_a$  が 6.1 であり、初期エンドソームやリサイクルエンドソームの pH 測定には適しているが、より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)。そこで本研究では、強い酸性を示すリソソーム内 pH の定量に適したレシオ型蛍光プローブの開発を目指した。

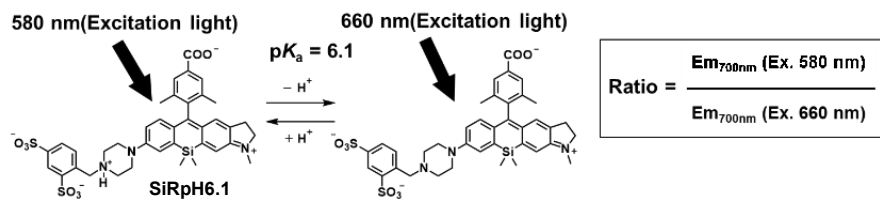


Figure 1. Structure of a ratiometric pH fluorescent probe, SiRpH6.1.

## 【結果】

### ① リソソーム内 pH の定量に適した $\text{pK}_a$ を持つ蛍光プローブの開発

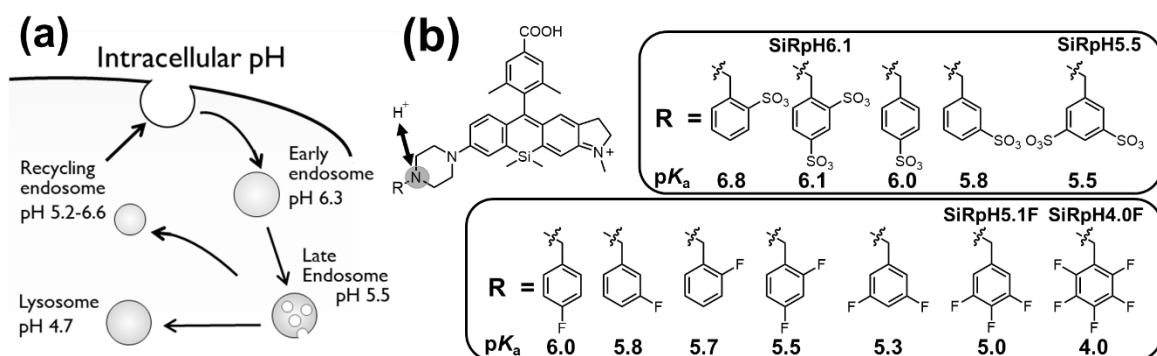
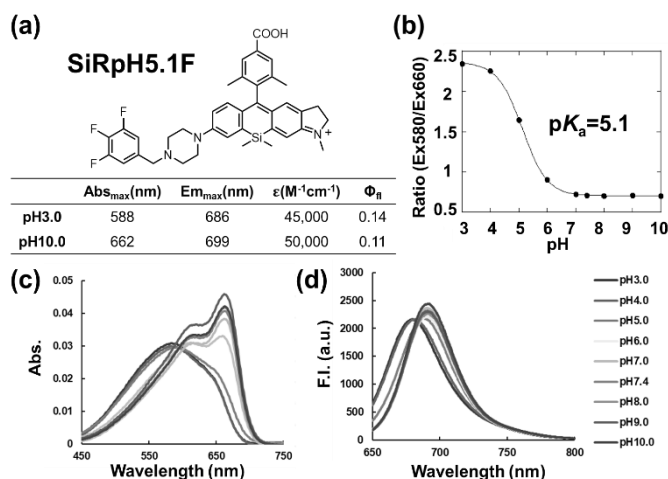


Figure 2. (a) pH values in the different subcellular compartments. (b)  $\text{pK}_a$  values of synthesized SiRpH probes.

本学修士課程において私は、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、様々なスルホ基を導入することで、 $\text{pK}_a$  を 6.1 から 5.5 に下げた SiRpH5.5 を開発することに成功した(Figure 2b)。しかしながら、SiRpH5.5 を標識した dextran を用いて MEF 細胞にて蛍光観察を行ったところ、蛍光プローブで測定可能な pH 範囲よりも低い pH を示すリソソームが多数

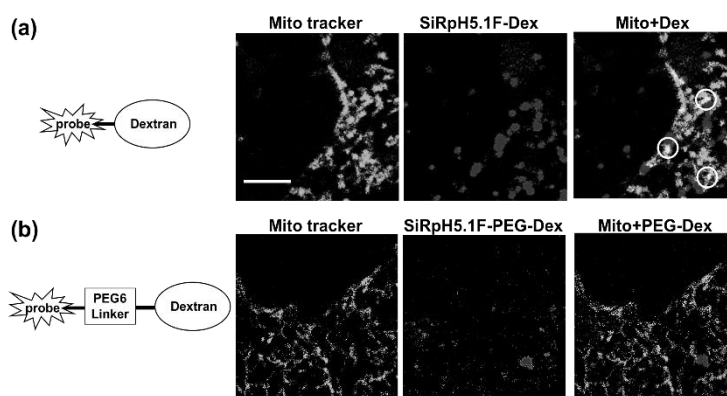
観察された。そこで、蛍光プローブの分子構造中のベンジル基にスルホ基ではなく、電子吸引性の高いフルオロ基を導入することで、 $pK_a$ の更なる低下を試みた。様々なフルオロ基の置換位置と置換基の数を変化させた pH プローブ群を合成し、それらの光学特性を調べた結果(Figure 2)、スルホ基では到達できなかった  $pK_a=5.1$  を示す pH プローブ, SiRpH5.1F の開発に成功した(Figure 3a,b)。開発した蛍光プローブは、塩基性から酸性にすることで吸収波長が 662 nm から 588 nm と約 80 nm 短波長化し、一方、蛍光波長は大きく変化は示さず、蛍光量子収率は何れの条件においても 10%以上と高い輝度を示す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)。さらに、フルオロ基を増やすことで、 $pK_a=4.0$  をもつ pH プローブ, SiRpH4.0F の開発にも成功した(Figure 2)。



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

## ② 蛍光プローブのリソソームへの局在制御

実際に、 $pK_a = 5.1$  を示す SiRpH5.1F を用いて、生細胞中のリソソーム内 pH の測定を行った。その結果、SiRpH5.1F はリソソームと共にミトコンドリアも染色した(Figure 4a)。これは、SiRpH5.1F の脂溶性の高さから dextran へと結合させる際に、一部 dextran に非特異的に吸着することで、生細胞へと応用した際にその吸着していた pH プローブがミトコンドリアへと局在したと考えられた。そこで、SiRpH5.1F に PEG6 リンカーを結合させることで、水溶性を上げミトコンドリアへの局在を防ぐことを試みた。実際に、PEG6 リンカーを挟み SiRpH5.1F を dextran に結合させた SiRpH5.1F-PEG-Dex を MEF 細胞に 6 時間インキュベーションし、エンドサイトーシスによってリソソームへとプローブを送達させた。その後、蛍光イメージングを行ったところ、SiRpH5.1F-PEG-Dex の蛍光は Mito tracker の蛍光と重なることなく、リソソームへと選択的に送達されたことが分かった(Figure 4b)。



**Figure 4.** (a) Co-staining of MEF cells with SiRpH5.1F-Dex and Mito tracker. The circles indicate merged regions. (b) Co-staining of MEF cells with SiRpH5.1F-PEG-Dex and Mito tracker. (Probe; Ex/Em = 580 nm / 690-750 nm, Mito tracker; Ex/Em = 488 nm / 500-530 nm)

## ③ 生細胞でのリソソーム内 pH の測定

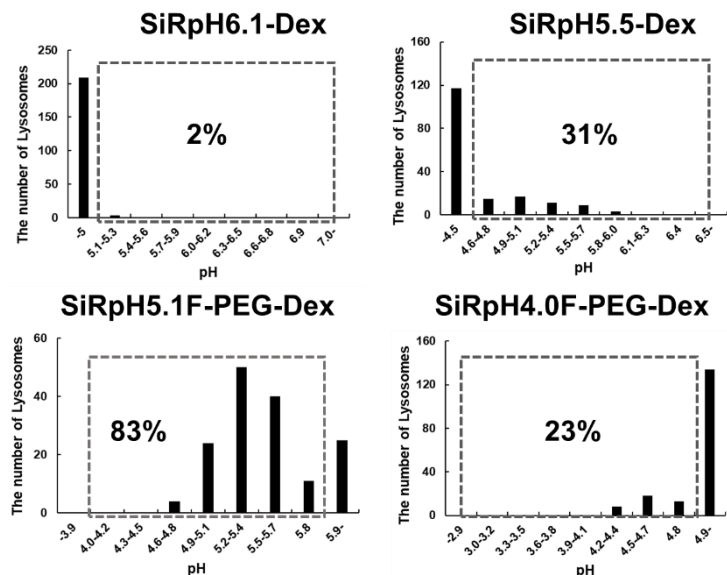
これまで当研究室で開発された SiRpH6.1-Dex ( $pK_a = 6.1$ ; Figure 1)と、SiRpH5.5-Dex ( $pK_a = 5.5$ ; Figure 2)及び SiRpH5.1F-PEG-Dex ( $pK_a = 5.1$ ; Figure 3)、SiRpH4.0F-PEG-Dex ( $pK_a = 4.0$ ; Figure 2)の4つの  $pK_a$  が異なる蛍光プローブを用いて、リソソーム内の pH 定量を行った(Figure. 5)。具体的には、リソソームのマーカー蛋白質である Lamp1(GFP 融合)を安定発現させた MEF 細胞に、各プローブを標識した 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 細胞から取り出し、pH の定量を行った。その結果、SiRpH5.1F-PEG-Dex は、リソソームの酸性側の

pH 分布も含め、最も多くのリソソームの pH を測定可能であり、リソソームの pH 測定に最も適した蛍光プローブであった。最後に、Lamp1-GFP 安定発現 MEF 細胞にて、V-ATPase 阻害剤である bafilomycin A1 を添加した時のリソソーム内 pH の変化を蛍光イメージングした。SiRpH5.1F-PEG-Dex を細胞内に導入した後、bafilomycin A1 の添加前後において、ランダムに 6 細胞をピックアップし pH の分布を測定した(Figure 6)。その結果、bafilomycin A1 の添加前後で pH 5.9 以上のリソソームの分布割合が大きく増加した(Average lysosomal pH; before pH= 5.6, after = 6.5)ことから、リソソームの中性化を観察することに成功した。

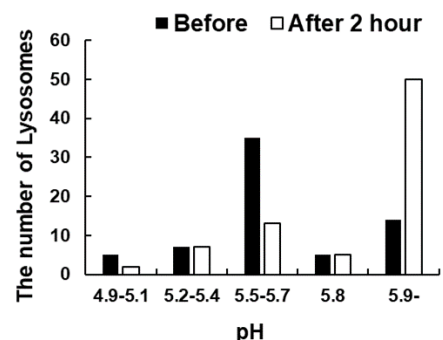
### 【総括・展望】

本研究において、細胞内の酸性オルガネラである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、PEG6 リンカーをうまく分子構造に導入することで、リソソーム選択的に蛍光プローブを送達することができた。更に、開発したプローブは吸収・蛍光波長が長いため、GFP との同時イメージングが可能であり、Lamp1-GFP を安定発現した MEF 細胞において、リソソームを Lamp1-GFP で識別することでリソソームの pH 分布を定量することが可能であった。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において、リソソーム内 pH とそれら機能について調べていきたい。

[参考文献] 1) *Proc Natl Acad Sci USA* 1978, 75, 3327; 2) Takahashi, S. et al. *J. Am. Chem. Soc.* 140, 5925–5933 (2018).



**Figure 5.** Populations of lysosomal pH measured with SiRpH6.1-Dex, SiRpH5.5-Dex, SiRpH5.1F-PEG-Dex and SiRpH4.4F-PEG-Dex. The dot frames indicate reliable pH measurement ranges by removing 10% above and below the ratio value. % indicates lysosomes in the dotted square / total lysosomes



**Figure 6.** Populations of lysosomal pH measured with SiRpH5.1F-PEG-Dex before and after addition of bafilomycin A1.