

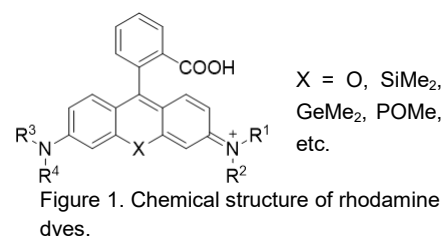
博士論文（要約）

生細胞におけるローダミン色素の
局在コントロールとその蛍光プローブ開発への応用

沼澤 宏治

【背景と研究目的】

ローダミン類とは、キサントン環の 3,6 位に窒素原子が結合した色素の総称であり (Figure 1)、高い蛍光量子収率や高い光退色耐性、高い水溶性に加えて、その分子構造を修飾することによって幅広い蛍光波長を有するという特長を持つ。そのため、これまでに様々な蛍光プローブの母核や蛍光ラベル化試薬として用いられてきた。特にキサントン環の 10 位の O 原子を他の原子に置換したローダミン類は、近赤外にまで達する長い蛍光波長を有し、動物個体への応用や複数の観察対象を同時に可視化する技術であるマルチカラーイメージングに貢献できる。そこで本研究では、ローダミン類を用いた蛍光プローブの分子設計の拡充及び、それを用いた新たな近赤外蛍光プローブの開発を目的とした。



【本論】

1. 細胞質集積性近赤外蛍光 Ca²⁺プローブの開発

カルシウムイオン(Ca²⁺)は神経伝達や筋収縮など様々な生命現象におけるセカンドメッセンジャーとして重要な役割を担っており、細胞質における Ca²⁺の濃度変動を可視化することは生命現象を解明する上で極めて重要である。カルシウムが関与する生命現象には多数の要素が関連するため、近赤外蛍光を有する細胞質集積性の Ca²⁺プローブはマルチカラーイメージングへ大きく貢献できると考えられるが、近年当研究室で開発された近赤外蛍光 Ca²⁺プローブ CaSiR-1 はリソソームへの局在を示す特長を有する。そこで、まずはその前段階として細胞質に集積するローダミン色素の開発に着手した。一般にローダミン類はキサントン環のカチオンによりミトコンドリアに集積することが知られているが、ベンゼン環 2 位にカルボン酸を有する Si-ローダミン類を母核としたプローブが細胞質に存在するがんタンパク質を染色するとの報告なされており (*Bioconjugate Chem.*, **2015**, *26*, 1513-1518.)、分子全体の電荷を 0 にしたことが重要であると考えられる。そこで、ベンゼン環の様々な位置にカルボキシ基を導入した Si-ローダミン類を合成し、生細胞へと応用したところ、ベンゼン環部位 2 位にカルボン酸を有する Si-ローダミン類は分子内に水溶性置換基であるカルボキシ基を有するにもかかわらず、細胞膜透過性が高いことが分かった。この色素は、ベンゼン環部位 2 位にメチル基を有する色素よりも、水溶液中での吸収・蛍光が弱いことから、この色素の膜透過性の高さはスピロ環化体を形成するためであると考えた。この知見をもとに、構造修飾によってローダミン類を細胞質へと集積させることを試みた。分子デザインとして蛍光色素分子全体の電荷を 0 にするためのベンゼン環部位 2 位へのカルボン酸の導入を行った (Figure 2a; R = COOH)。また、細胞内への導入効率向上と細胞内滞留性の向上のため、アセトキシメチル基 (AM 基) で保護したイミノ二酢酸部位を導入した。AM 基によって保護された色素は脂溶性の向上によって細胞膜透過性が向上するとともに、細胞内へと導入された後は細胞内エステラーゼにより AM 基が

切断され、細胞外への漏出性が低下し細胞内に滞留する。これらローダミン蛍光色素を HeLa 細胞へと応用し蛍光イメージングを行ったところ、期待通りに細胞質から強い蛍光が観察された (Figure 2b; R = COOH)。一方、ベンゼン環部位 2 位にメチル基を導入したローダミン色素はミトコンドリア及びリソソームへの集積を示したことから (Figure 2b; R = Me)、ベンゼン環部位のカルボン酸の導入はローダミン色素の細胞内局在において重要な影響を与えると考えられた。

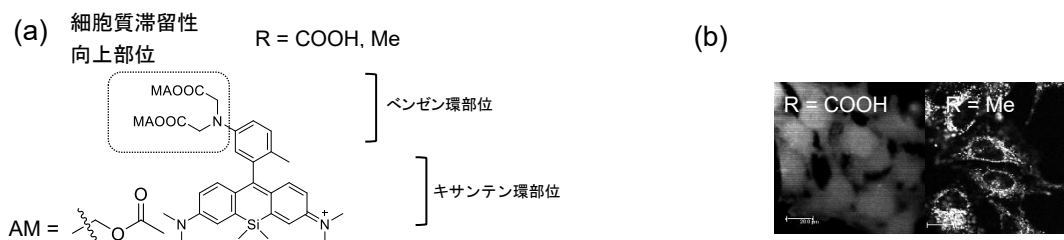


Figure 2. (a) Molecular design of rhodamines which can be retained in the cytosol. (b) Fluorescence images of HeLa cells stained with 1 μ M O-rhodamine and Si-rhodamine with R = COOH or Me for 1 hr at 37 $^{\circ}$ C. Ex./Em. = 650/670-750 nm. Scale bars: 20 μ m.

続いて、ベンゼン環部位 2 位にカルボン酸を持つ Si-ローダミンを蛍光団母核として細胞質の Ca^{2+} 濃度変動を可視化するプローブ CaSiR-2 の分子設計・合成を行った (Figure 3a 右)。開発したプローブは Ca^{2+} の存在によって 26 倍の蛍光上昇を示した (Figure 3b)。次に、その AM 保護体である CaSiR-2 AM を HeLa 細胞へと応用したところ、期待通りに細胞質及び核に集積し、リソソームへの集積はほとんど見られなかった (Figure 3c 左)。また、本プローブはヒスタミン刺激による細胞内の Ca^{2+} 濃度変動を高い S/N 比で捉えることに成功した (Figure 3c 右)。更に、CaSiR-2 AM をラット脳スライスへと応用したところ、CaSiR-1 AM と比較して神経細胞の自然発火を S/N 比高く捉えることに成功した (Figure 3d)。CaSiR-1 AM はラット脳スライスにおいてもリソソームへの局在が観察されることから、ラット脳スライス切片における CaSiR-2 AM の高い S/N 比は蛍光プローブを細胞質に集積させたことによると考えられた。

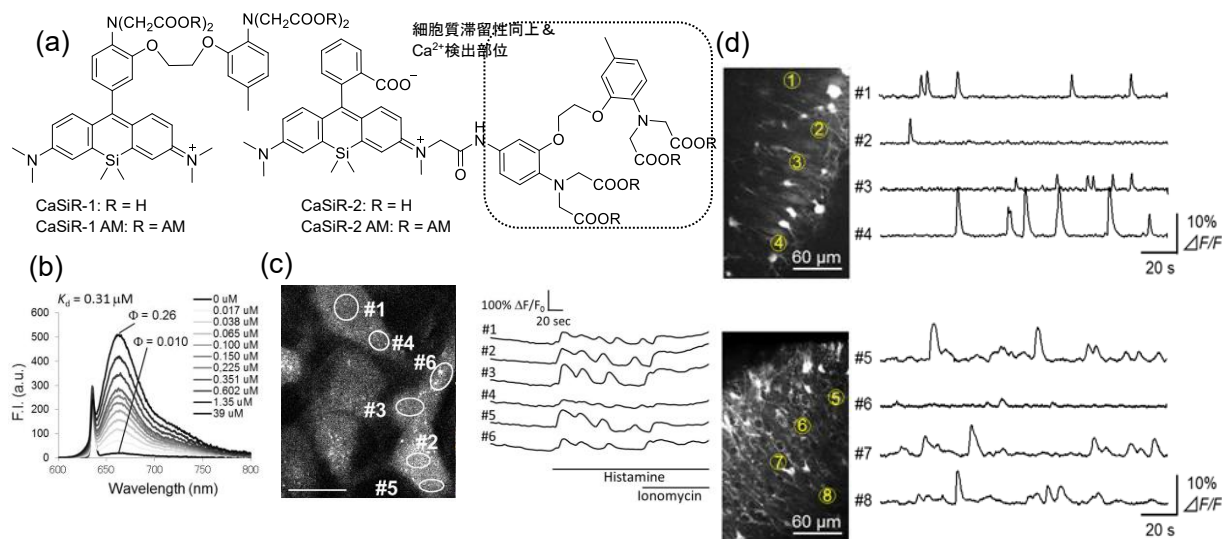


Figure 3. (a) Chemical structures of CaSiR-1 and CaSiR-2. (b) Fluorescence spectra of CaSiR-2 in the presence of various concentrations of Ca^{2+} in 30 mM 3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS) buffer containing 100 mM KCl and 10 mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA), pH 7.2. Ex. 635 nm. (c) Fluorescence images of HeLa cells incubated with 3 μM CaSiR-2 AM for 30 min at 37 °C. Cells were stimulated with 1 μM histamine at 90 sec and 5 μM ionomycin at 210 sec. Ex./Em. = 635/660-750 nm. Scale bars: 20 μm . (d) Fluorescence images of mouse brain slice incubated with 5 μM CaSiR-2 AM (top) and 5 μM CaSiR-1 AM (bottom) for 30 min.

2. 葉酸受容体検出蛍光プローブ FolateSiR-1 の開発と応用

ローダミン類を細胞質以外に集積させる試みとして、細胞膜上に発現する葉酸受容体を可視化する蛍光プローブの開発を行った。葉酸受容体は卵巣がんや子宮内膜がんにおいての過剰発現やマウス神経管閉鎖部での部位特異的な発現が報告されており、臨床医学・生命科学において重要なターゲットである。分子デザインとしては Figure 4a に示すように、蛍光団母核としては動物個体への応用を考慮して近赤外光領域に蛍光を有する Si-ローダミン類を用い、葉酸受容体に対するリガンドである葉酸と蛍光団とを水溶性の高いペプチドリンカーで結合させた分子をデザイン・合成した。また、Si-ローダミン色素の構造として、ベンゼン環部位 2 位にカルボン酸を持つ色素を母核とした FolateSiR-1 と、同じく 2 位にメチル基を持つ色素を母核とした FolateSiR-2 を合成した。両プローブを葉酸受容体が過剰発現している KB 細胞へと応用した結果、FolateSiR-1 は細胞膜上のみから蛍光が観察された (Figure 4b 左上)。また、この蛍光は 1 mM 葉酸による競合阻害によって消失したため (Figure 4b 右上)、FolateSiR-1 は葉酸受容体を選択的に可視化していると考えられた。一方、FolateSiR-2 は細胞膜上の蛍光に加え、細胞内からも点状の蛍光が観察された (Figure 4b 左下)。この点状の蛍光は葉酸競合実験においても消失しないことから (Figure 4b 右下)、一部の FolateSiR-2 は葉酸受容体非依存的に細胞内に取り込まれていると考えられた。また、これら両プローブの蛍光母核に相当する色素を、ジオキサンを加えた水溶液中で吸収スペクトルを測定したところ、FolateSiR-2 の蛍光母核の色素ではジオキサンの濃度上昇に伴い吸光度の変化が生じなかったのに対し、FolateSiR-1 の蛍光母核の色素ではジオ

キサンの濃度上昇に伴い吸光度が低下したことから、FolateSiR-1 は細胞内へ取り込まれた場合に、その脂溶性環境によってスピロ環化体を形成するため細胞内から蛍光が観察されないものと考えられた。

更に開発したプローブをより高次の系へと応用した。具体的には、マウス胚の染色へと応用したところ、FolateSiR-2 においては胚全体から点状の蛍光が観察されたのに対し、FolateSiR-1 は folate receptor α が高発現していると報告されている神経管閉鎖部において強い蛍光が観察された (Figure 4c; 白丸部)。また、KB 細胞を用いた腫瘍モデルマウスへと応用したところ、FolateSiR-2 は投与後 6 時間経過後も組織非特異的なバックグラウンド蛍光が観察された一方で、FolateSiR-1 はバックグラウンド蛍光の消失が早く、プローブ投与後わずか 30 分で高い S/N 比で腫瘍の蛍光観察が可能であった (Figure 4d)。

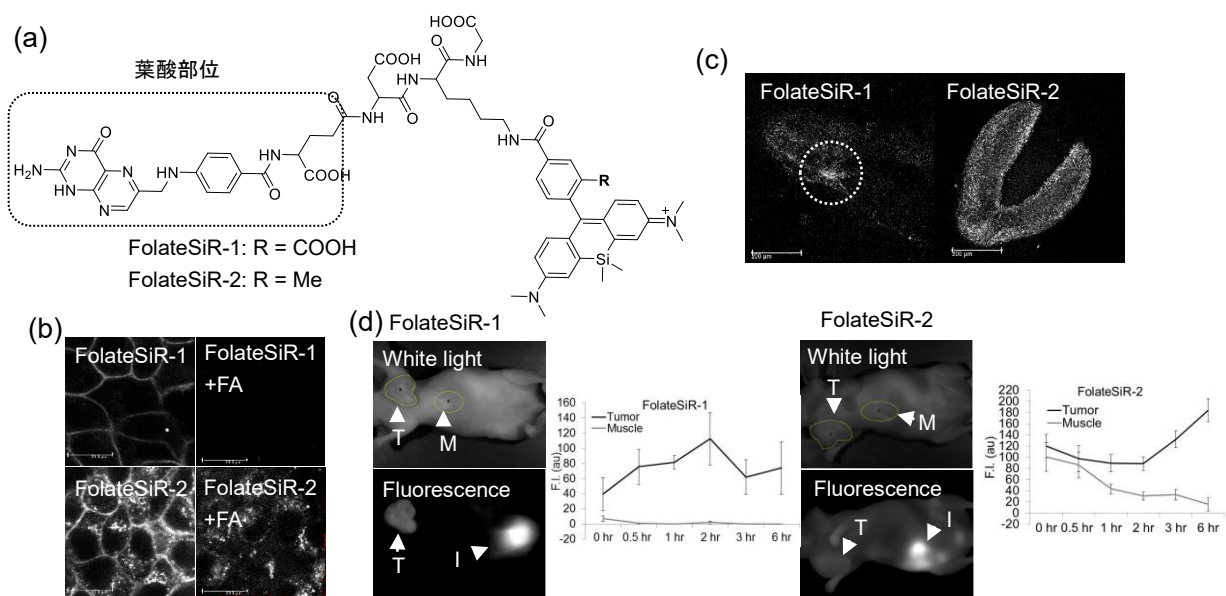


Figure 4. (a) Molecular design of Si-rhodamine-based fluorescent probes for folate receptors. (b) Fluorescence images of KB cells incubated with 5 μ M FolateSiR-1 or FolateSiR-2 in the presence or absence of 1 mM folic acid (FA) for 30 min at 37 $^{\circ}$ C. Ex./Em. = 650/670-750 nm. Scale bars: 20 μ m. (c) Fluorescence images of 8.5-day mouse embryos incubated with 20 μ M FolateSiR-1 or FolateSiR-2 for 30 min. It is reported that folate receptors are expressed at the neuronal tube closing area (white circle). Scale bars: 200 μ m. (d) In vivo imaging of KB tumor-bearing mice injected with 100 μ M FolateSiR-1 in 100 μ L saline or 100 μ M FolateSiR-2 in 100 μ L saline (n = 3). Images were obtained at 30 min after probe loading. Ex./Em. = 661/700-800 nm. T: Tumor; M: Muscle; I: Intestine.

【結論】本研究において、私はベンゼン環部位 2 位にカルボン酸を有するローダミン色素の構造を利用することで、従来のローダミン色素とは異なる生細胞での局在を示す蛍光プローブの開発に成功した。具体的には細胞質において Ca^{2+} の濃度変動を S/N 比高く捉えることができる実用的な近赤外蛍光プローブおよび、細胞膜上の葉酸受容体を選択的に可視化できる近赤外蛍光プローブの開発に成功した。本研究における知見は、標的とする生体分子を生細胞の適切な場所で可視化する実用的な蛍光プローブの開発につながると期待される。