

博士論文（要約）

新規蛍光寿命イメージングプローブによる
細胞内小胞の pH 測定

國府田 絹子

論文の内容の要旨

論文題目 新規蛍光寿命イメージングプローブによる細胞内小胞の pH 測定

氏名 國府田 絹子

リソソームに代表される細胞内小胞の pH は酵素活性やタンパク質の機能を制御することが知られている。そのため、生細胞における小胞内腔の局所的な酸性 pH 変化をライブで観測することは、生体機構を解明する上で非常に重要である。

現在、pH 測定に汎用されている手法は、pH 感受性蛍光プローブ及び蛍光タンパク質を用いた蛍光強度イメージング法であるが、蛍光強度測定では、蛍光プローブや蛍光タンパク質の細胞内における局在、濃度、光褪色、励起波長や励起光強度、細胞の自家蛍光などにより蛍光強度が変動してしまうことから、絶対値を蛍光顕微鏡下で定量評価することは難しい。また、これらの要因による影響を補正する手法として、レシオメトリック測定が用いられているが、複数波長での励起・蛍光観測が必要であるため、レンズ色収差や測定波長領域の占有といった課題がある。

近年、このような問題を克服し得る新たなイメージング技術として、蛍光強度ではなく蛍光寿命を画像化する“蛍光寿命イメージング法 (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy; FLIM)”が、注目を集めている。蛍光寿命は、分子が光励起されてから基底状態に戻る際に発する蛍光発光の強度が $1/e$ に低下するまでの時間と定義され、各分子種が固有の値を持つ。蛍光寿命は、分子の種類及び分子の周囲環境のみで決まり、濃度、光褪色、一光子・多光子励起、励起波長、励起光強度などの実験条件に依存しない。従って、これらの因子の影響を受けることなく、分子の蛍光寿命の変化から、イオン濃度、粘性、温度、他分子との相互作用など、分子の周囲の環境変化を直接精密に検出・定量することが可能である。

本研究では、蛍光寿命イメージング法 (FLIM) により細胞内微小環境における酸性 pH の可視化・評価を可能とする、一波長励起一波長測光型の有機小分子蛍光寿命イメージングプローブの開発を行い、細胞内小胞の pH をより正確に決定する手法の確立を目指した。

本論文では、細胞内小胞及び蛍光寿命イメージング法についての概説 (第 1 章)、FLIM 測定に適した pH 感受性蛍光寿命イメージングプローブの設計・開発 (第 2 章)、開発した新規蛍光寿命イメージングプローブによる細胞内小胞の pH 測定 (第 3 章) について論述した。下記に、第 2 章と第 3 章にまとめた実験結果および考察を記述する。

1. pH 感受性蛍光寿命イメージングプローブの設計・開発

pH 変化に伴い適切な蛍光寿命変化を示す蛍光プローブの蛍光寿命制御法として、光誘起電子移動 (Photoinduced Electron Transfer; PeT) に着目した。PeT とは、励起光によって蛍光団が励起されてから、蛍光を發して基底状態へ戻るより前に、近傍の電子供与部位から励起状態の蛍光団へ電子移動が起きて、蛍光が消光する現象のことである。蛍光強度イメージングにおいて、PeT による蛍光制御を用いた蛍光プローブは、PeT によってほぼ無蛍光となる設計により、On/Off 型として開発・利用されることが多い。しかし、蛍光寿命イメージングでは、各分子フォームの蛍光寿命の比率を求める必要があるため、pH 変化を測定する際には、蛍光プローブのプロトン化フォームと非プロトン化フォーム共に蛍光を發する必要がある。

本研究では、PeT による消光の度合いを調整することにより、各分子フォームが検出可能な蛍光量子収率を保持するような設計を行い、各フォーム固有の蛍光寿命及びその存在割合から算出した平均蛍光寿命 $\langle\tau\rangle$ と pH を対応させることにより、プローブの周囲環境 pH を定量するという方法を考えた。

新たに開発した蛍光プローブは、PeT を動作原理として、光褪色耐性に優れているローダミン骨格を持つ蛍光団に pH 感受性の電子供与基として各種アニリンを導入した一連の誘導体である。これらの誘導体は、中性 pH 条件下において、各種アニリンが持つアミノ基の電子供与能により、電子供与部位の電子密度が上がり、HOMO エネルギーレベルが高くなるため、PeT による蛍光消光が生じる。一方、pH が酸性化すると、アミノ基の窒素原子がプロトン化され、電子供与部位の電子密度が低下するため、HOMO エネルギーレベルが下がって、PeT が解消されることにより、強蛍光性となる。従って、アニリンの電子密度を最適化することにより、これら誘導体の“N-非プロトン化フォーム”における蛍光消光の度合いを調整することができ、プロトン化前後の分子フォームをそれぞれ固有の蛍光寿命を持つ 2 種の分子フォームとして区別して検出することが可能となる。

蛍光寿命イメージングプローブの開発においては、まず、各種アニリン・アミンを、細胞膜透過型のプローブとして 5-TAMRA に、また細胞膜非透過型のプローブとして Alexa488 に導入した一連の誘導体を合成し、その特性を精査した。その結果、目標としていた適度な消光を生じさせる電子供与基にはアニリン誘導体が適していることが明らかとなった。また、アニリン誘導体の窒素上置換基及びその配向性により、PeT による消光の度合い、 pK_a 及び蛍光寿命特性が大きく変化することを見出した。

特に、電子供与基として *N,N*-ジメチルアニリンを 5-TAMRA に導入した *p*-DiMeNTMR 及び Alexa488 に導入した誘導体 *m*-DiMeNAF488 と *o*-DiMeNAF488 は、pH 4-6 程度の酸性下において十分に明るく、蛍光寿命測定から算出した pK_a は、アミノ基の配向性により $pK_a = 4.5 \sim 5.0$ の値を示すことから、生体内における酸性環境の FLIM 測定に適した特性を有することが示された。

中でも、ジメチルアミノ基 (-N(CH₃)₂) を *meta* 位と *ortho* 位に有する *m*-DiMeNAF488 と *o*-DiMeNAF488 については、蛍光寿命 $pK_a = 4.5$ と $pK_a = 4.9$ という特性を持ち、またプロトン化前後の各分子フォームの固有蛍光寿命の差であるダイナミックレンジも 3.3~3.4 ns と大きく、詳細な pH との照合を行い易いことから、細胞内小胞の pH を測定するにあたり、理想的な光学特性を持つことが明らかになった。

2. 新規蛍光寿命イメージングプローブによる細胞内小胞の pH 測定

本研究において開発した新規蛍光寿命イメージングプローブを用いて、生細胞の細胞内酸性小胞 pH を FLIM により測定することを試みた。

5-TAMRA 誘導体である *p*-DiMeNTMR はリソソームを含む酸性小胞内に局在することが明らかになったことから、4 種の細胞について FLIM 測定を行った。各細胞の細胞内小胞 10 カ所の ROI について平均蛍光寿命を算出すると、HeLa 細胞は pH=4.9、A431 細胞は pH=5.4、Vero 細胞は pH=4.7、Cos-7 細胞は pH=5.2 に相当することがわかった。また、*p*-DiMeNTMR の局在と pH の関係をより明確にするため、酸性小胞を標識する Lyso Tracker Green DND-26、Dextran-Alexa488 と共染色した細胞を用いた FLIM 測定によっても、酸性小胞内部の pH 測定を行うことが可能であることを示した。さらに、V-ATPase 阻害剤である Bafilomycin A1 と Concanamycin A を用いて、薬剤添加前後における細胞内小胞の pH 変化を観測することが可能であることを確認した。これらの結果より、*p*-DiMeNTMR を用いた FLIM 測定により、細胞種及び細胞のコンディションによって異なる酸性小胞 pH の違いを検知できる可能性が示された。

Alexa488 誘導体である *m*-DiMeNAF488 は細胞膜透過性を持たないため、貪食能を持つ RAW264.7 細胞を用いて、酵母由来のタンパク質-糖複合体である Zymosan と共にエンドサイトーシスの機構を利用することで細胞内に取り込ませ、Zymosan 及び *m*-DiMeNAF488 を含んだファゴソーム内の pH について FLIM 測定を行った。個々のファゴソームについて、ROI を選択して蛍光寿命を算出すると、pH=5.4~5.5 に相当することがわかった。また、V-ATPase 阻害剤である Bafilomycin A1 と Concanamycin A を添加した場合、ファゴソーム内の pH は添加前の pH = 5.3~5.6 から添加後は pH = 6.0~6.2 へと変化することを確認した。さらに、ファゴソームが形成されて細胞内で成熟する際のファゴソーム内における pH 変化を、FLIM によるタイプラプス測定で観測することが可能であると考え、測定を試みた。その結果、Zymosan を含むファゴソーム内が、小胞形成直後の pH = 6.2~6.5 から、8 分後には pH = 5.6~5.8、20 分後には pH = 5.3 まで酸性化されていく様子を観測することに成功した。これらの結果より、Zymosan 及び *m*-DiMeNAF488 を用いた FLIM 測定により、ファゴサイトーシスの動態を pH の定量と共にライブイメージング観測できることが示された。

3. 結語

本研究では、pH 変化に伴い適切な蛍光寿命変化を示す一波長励起一波長測光型の有機小分子蛍光寿命イメージングプローブの開発を行った。また、新規開発プローブ *p*-DiMeNTMR 及び *m*-DiMeNAF488 を用いた生細胞の FLIM 測定により、従来の蛍光強度測定では難しかった定量性の高い細胞内小胞の pH 測定が可能であることを示した。今後、本手法を用いることにより、正常・疾患細胞内小胞の pH 比較、複数の蛍光プローブを併用した多色 FLIM 測定による小胞と他の細胞内小器官の融合・分離に伴う pH 変化観測など、新たな生物学研究の展開が期待される。