

# 博士論文

論文題目 細胞膜近傍のカリウムイオン濃度変化を  
可視化するタンパク質複合型蛍光プローブの開発

氏名 平田 智也

第一章 序論 .....	1
第一節 K <sup>+</sup> と生命現象 .....	2
第二節 既存の K <sup>+</sup> 検出法 .....	4
第三節 本研究の目的と方法 .....	9
第二章 細胞膜局在型 K <sup>+</sup> プローブの設計と開発 .....	11
第一節 細胞膜へ局在させる K <sup>+</sup> プローブの選択 .....	12
第二節 細胞膜局在のための手法の選択 .....	18
第一項 脂質結合による細胞膜局在 .....	18
第二項 細胞膜結合型タンパク質の利用 .....	21
第三項 細胞膜へ発現するタグタンパク質に対する in situ 標識 .....	23
第三節 K <sup>+</sup> 応答性 HaloTag ligand の設計・合成と評価 .....	25
第三章 TLSHalo を用いた細胞膜近傍における K <sup>+</sup> 濃度変化の検出 .....	39
第一節 K <sup>+</sup> の局所添加に伴う K <sup>+</sup> 拡散の検出 .....	40
第二節 K <sup>+</sup> ionophore を用いた K <sup>+</sup> 流出の検出 .....	44
第三節 Ca <sup>2+</sup> 依存性 K <sup>+</sup> チャネルを介した K <sup>+</sup> 流出の検出 .....	47
第四節 全反射照明蛍光顕微鏡を用いた細胞底面における K <sup>+</sup> 流出の検出 .....	48
第五節 Cell sheet 中の細胞間隙における K <sup>+</sup> 濃度変化の検出 .....	52
第四章 K <sup>+</sup> チャネル標識による、K <sup>+</sup> チャネル活動の蛍光検出 .....	54
第一節 細胞膜上における K <sup>+</sup> プローブと K <sup>+</sup> チャネルの位置関係 .....	55
第二節 BK チャネル N 末端への HaloTag タンパク質の導入 .....	58
第三節 TLSHalo による蛍光標識 .....	61
第四節 内部標準および FRET acceptor としての蛍光タンパク質の利用 .....	64
第五章 より高次な系での K <sup>+</sup> 検出を指向した 2 光子励起 K <sup>+</sup> プローブの開発研究 .....	67
第一節 2 光子励起顕微鏡を用いた K <sup>+</sup> イメージングの意義 .....	68
第二節 2 光子励起に適した蛍光団を持つ K <sup>+</sup> プローブの設計・合成と評価 .....	69
第六章 総括と今後の展望 .....	79
第七章 実験の部 .....	85
第八章 参考文献 .....	112

# 第一章

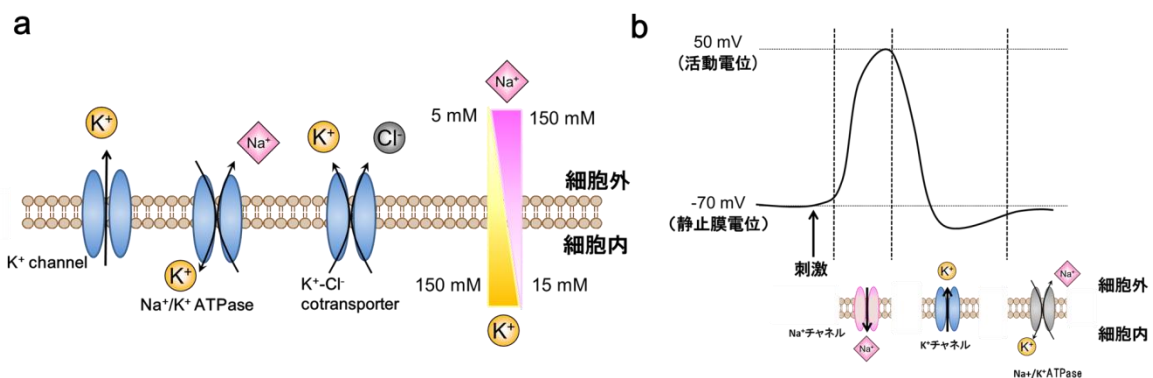
## 序論

## 第一章 序論

### 第一節 $K^+$ と生命現象

$K^+$ は  $Na^+$ や  $Ca^{2+}$ と並んで生体内に多量に存在する金属イオンであり、細胞外液で 5 mM、細胞内液で 150 mM 程度存在する<sup>1</sup>。この細胞膜を隔てた  $K^+$ の濃度勾配の形成と維持は、細胞膜に存在する  $K^+$ チャネルや  $Na^+/K^+$  ATPase、 $K^+-Cl^-$  cotransporter などの様々なタンパク質によって行われており (Figure 1-1-1(a))、これらのタンパク質による  $K^+$ の細胞内外の移動は細胞の膜電位や細胞内外のイオンバランスを規定することで、神経伝達や筋肉の運動、細胞死や細胞増殖といった様々な生命現象に関わっている。

一例として活動電位の発生について述べる。神経細胞軸索や筋細胞における静止膜電位は  $K^+$ 漏洩チャネル (直列ポアドメイン型  $K^+$ チャネル) の存在によって  $K^+$ の平衡電位 (-90 mV) に近い -70 mV 程度で安定しているが、 $Ca^{2+}$ 流入刺激とそれに続く  $Na^+$ 流入によって細胞が脱分極すると、遅れて電位依存型  $K^+$ チャネルが開口し、 $K^+$ が細胞外へ流出することで細胞膜は再分極する。その後、 $Na^+/K^+$ ATPase が細胞外へ流出した  $K^+$ と細胞内へ流入した  $Na^+$ を逆向きに輸送し、イオンの分布を初期状態へと戻している (Figure 1-1-1 (b))。

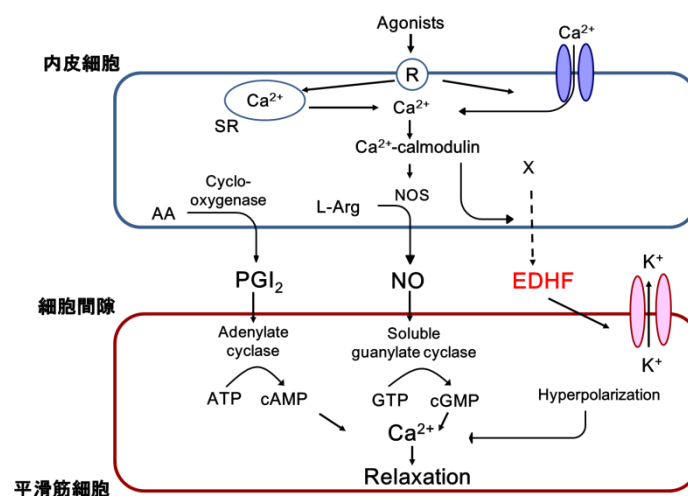


**Figure 1-1-1.** (a)  $K^+$  distribution across cellular membrane is generated by  $K^+$  channels and transporters. (b) The mechanism of action potential generation.

以上は単一細胞における活動電位の発生を簡単に記述したものだが、このような生命現象をより高度に組織化されたサンプルにおいて、特定の細胞の近傍における  $K^+$  の動態に着目して更に詳細に観察することで、生命現象さらには病態に対する理解がさらに深まることが期待される。

そのような研究は近年盛んに報告されており、例えば神経ネットワークにおいて、活動電位発生に伴ってシナプス後膜から  $K^+$  が流出するが、これによって生じる細胞外  $[K^+]$  変化を近傍のアストロサイトが調節していること、またそのような調節機構の変調がてんかんの病態と関わりを持つことが報告されている<sup>2,3,4,5,6</sup>。

また別の例として血管平滑筋の弛緩メカニズムを挙げる。血管内皮細胞がプロスタグランジン  $I_2$  や一酸化窒素の分泌によって血管平滑筋の弛緩を制御することが知られているが、加えてそれら以外の EDHF (Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor, 内皮細胞由来過分極因子) の存在が提唱されている<sup>7,8</sup> (Figure 1-1-2)。その実態としてこれまでに Epoxyeicosatrienoic acid (EETs)、gap junction、 $H_2O_2$  などの可能性が報告されているが、 $K^+$  もラットの細動脈における EDHF の候補として報告がなされており<sup>9</sup>、平滑筋細胞表面における  $K^+$  濃度の変化が単なる過分極の結果ではなく、内皮細胞から平滑筋細胞への情報伝達を担う可能性が示唆されている。



**Figure 1-1-2.** Relaxation of smooth muscle cells in blood vessel is regulated by endothelial cells.

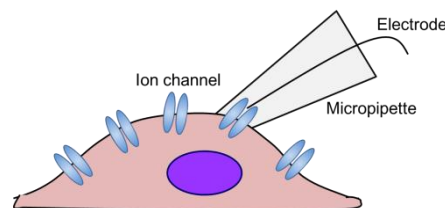
以上の例のように細胞外、特に特定の細胞の表面での  $K^+$  濃度変化と生命現象の関係は大きな注目を集めているが、これらの研究は主にパッチクランプ法による電流の記録、 $K^+$  チャネルの遺伝子導入・遺伝子欠損、そして選択的阻害剤による機能阻害などを用いて行われており、 $K^+$  そのものの動態を直接検出・可視化可能な汎用性のある手法は次節で述べるように限られている。そのため、これを実現する新たな手法の開発は様々な生命現象の解明につながる重要なものとなる。

## 第二節 既存の $K^+$ 検出法

本節では、現在使用されている各種の  $K^+$  検出法について具体的に述べる。細胞や生体サンプルにおける既存の  $K^+$  検出法は、 $K^+$  濃度の変化を細胞膜で生じる電流や電位などの電気的変化や  $K^+$  の代替となる金属イオンの動きなどの形で間接的に測定する手法と、 $K^+$  そのものを直接測定する手法とに分けて考えることが出来る。以下にこれらを順に紹介する。

### 間接的な検出法①: パッチクランプ法

対象となるイオンチャネルをパッチ電極ではさみ、チャネルの開口により生じるイオン電流を電流・電圧の変化として記録する方法 (Figure 1-2-1)。チャネル 1 分子レベル、または細胞全体で流れる電流を測定でき、最も標準的で信頼性の高い方法として汎用されているが、測定部位を直接侵襲してしまう、電気的な変化を伴わないトランスポーターの評価には適用できない、操作に技術が必要であり、広範囲における時空間的な観察は困難であるなどの難点がある。



**Figure 1-2-1.** Images of patch clamp technique.

## 間接的な検出法②: $K^+$ の代替イオンを用いた方法

$Rb^+$ の原子吸光測定法:  $K^+$ と同族で生体内での挙動が類似している  $Rb^+$ を細胞に取り込ませ、 $K^+$ チャネルの開口に伴って放出される  $Rb^+$ を原子吸光測定により定量することで  $K^+$ チャネルの活動を測る方法 (Figure 1-2-2)。特に  $K^+/Cl^-$ の共輸送系のように電気的な変化を伴わない  $K^+$ の移動を検出する際に有用だが、特別な機械と手間を必要とし、また細胞の破碎抽出液を測定するためリアルタイムでの観察は困難である。

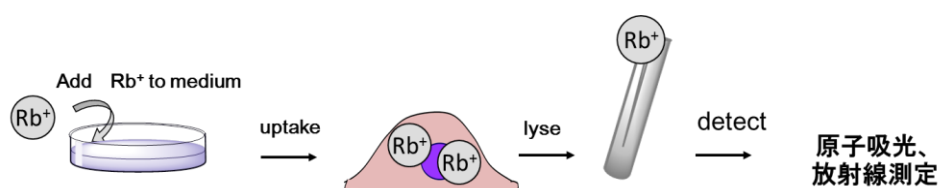


Figure 1-2-2. Images of  $Rb^+$  assay.

## $Tl^+$ 検出蛍光プローブを用いた方法:

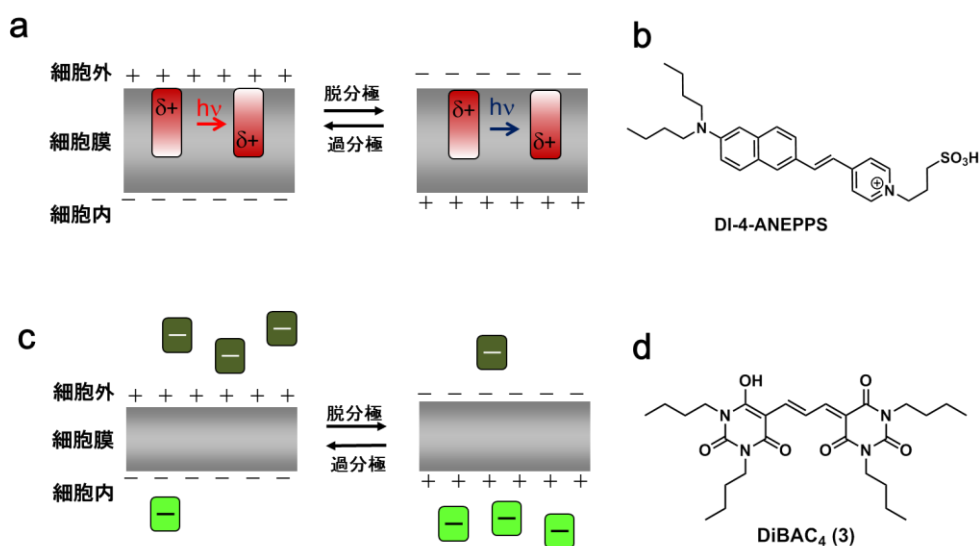
$Tl^+$ が  $K^+$ チャネルを通過する性質を利用して、予め細胞に取り込ませた  $Tl^+$ の流出を  $Tl^+$ 選択的な有機小分子蛍光プローブを用いて測定する。FluxOR™カリウムチャネルアッセイキットとして invitrogen から市販されている。 $Rb^+$ のように細胞を破碎する必要がなく、生細胞での利用が可能だが、 $Tl^+$ による前処理の必要性や  $Tl^+$ の毒性の問題などから薬剤スクリーニングにおける利用に留まっており、生体サンプルでの蛍光イメージングには用いられていない。

## ・間接的な検出法③: 膜電位検出蛍光プローブを用いた測定

細胞の膜電位の変化に応答して蛍光を増大させる有機小分子蛍光プローブを用いて、 $K^+$ チャネルの活性を間接的に測定する方法。Figure 1-2-3 に示した 2 つのタイプがある。共に操作は簡便で広範囲の時空間的な蛍光変化を観察可能だが、膜電位の変化を伴わない輸送系の活性測定はできない。Figure 1-2-3(a)に示した fast-response type は細胞膜に対して親和性を持ち、脱分極に伴う分子内の分極の程度の変化に伴う波長変化を検出する<sup>10</sup>。応答

はミリ秒オーダーと早く膜電位変化の蛍光イメージングに適するものの、蛍光の変化量は10%/100 mV 程度とわずかであり感度の良い測定は難しい<sup>11,12</sup>。

Figure 1-2-3(c)に示した slow-response type は負に帯電した脂溶性のプロープであり、分極した状態では細胞外に存在するが脱分極すると細胞内へ移動し、タンパク質や膜系の構造へ結合して高蛍光性となる。十分な応答を得るまでに分単位の間がかかるため、生体サンプルを用いたリアルタイム観察には向いておらず、チャネル作用薬のスクリーニング等の用途に主に用いられる<sup>13</sup>。近年では細胞膜外側に局在させた色素と細胞膜内を動く膜電位プローブとの間で生じる FRET を利用して測定時間を短縮する試みなどもなされているが、イメージングでの汎用には至っていない<sup>14</sup>。



**Figure 1-2-3.** Membrane potential fluorescent probes. (a) Mechanism of fast-response type membrane potential fluorescent probes. (b) Structure of DI-4-ANEPPS, a representative example of fast-response type membrane potential fluorescent probes. (c) Mechanism of slow-response type membrane potential fluorescent probes. (d) Structure of DiBAC<sub>4</sub>(3), a representative example of slow-response type membrane potential fluorescent probes.



### K<sup>+</sup>を直接検出する手法①: K<sup>+</sup>選択的電極の利用

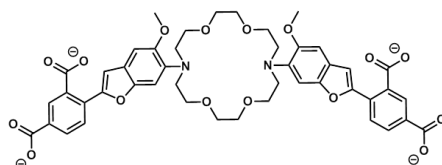
K<sup>+</sup>と選択的に相互作用するイオノフォアを担持した膜(電極膜)を持った電極(液膜電極)を利用する方法<sup>15,16</sup>。イオノフォアとしてはクラウンエーテルなどが用いられる。参照電極とともに試料液に浸すことで試料中の K<sup>+</sup>を定量できるため、環境検査や血液などの生体試料の K<sup>+</sup>濃度分析などに用いられる。細胞や組織切片で放出される K<sup>+</sup>の測定に用いられている例もあるが、その場合は侵襲的なので正確な測定には高度な操作技術が求められるため汎用性は高くない。また、空間的な K<sup>+</sup>の分布を可視化するには不向きである。

### K<sup>+</sup>を直接検出する手法②: K<sup>+</sup>検出蛍光プローブを用いた測定

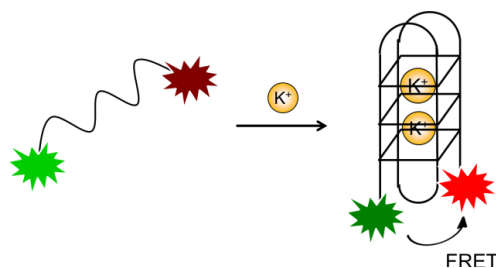
K<sup>+</sup>を認識して光学特性が変化するプローブ(K<sup>+</sup>プローブ)を用いて K<sup>+</sup>濃度の変化を検出する方法であり、簡便な操作で高感度な検出を実現する可能性を持つ。しかしながら、市販されている代表的な K<sup>+</sup>プローブである PBFI (Figure 1-2-4 (a))<sup>17</sup>は細胞内の K<sup>+</sup>イメージングには用いられるものの<sup>18,19,20</sup>、K<sup>+</sup>に対する解離定数が 7 mM なのに対して Na<sup>+</sup>に対する解離定数も 21 mM と、K<sup>+</sup>認識部位として用いられているクラウンエーテルのイオン選択性の低さにより Na<sup>+</sup>もある程度認識してしまい、また細胞内外のプローブの局在の制御が難しいことから、Na<sup>+</sup>が高濃度に存在する細胞外での K<sup>+</sup>検出という用途においては汎用されていない。K<sup>+</sup>選択性の高い別の K<sup>+</sup>認識部位として核酸の構造体である G quadruplex を用いた K<sup>+</sup>プローブも開発されているが、これらは K<sup>+</sup>に対する解離定数が 10<sup>-1</sup>-10 mM 程度と、生体における K<sup>+</sup>濃度変化を感度よく検出するには高すぎる親和性を有し、汎用されるには至っていない (Figure 1-2-5)<sup>21,22</sup>。

近年では H. He らによって Na<sup>+</sup>選択的なキレーターである TAC (Triazacryptand) キレーターが開発され<sup>23</sup>、これを用いた K<sup>+</sup>プローブの開発が複数報告されている<sup>24,25,26,27,28,29</sup>。Verkman らによって開発された TAC-Red や TAC-Lime<sub>dex</sub> はその一例である<sup>24,30,31</sup>(Figure 1-2-6)。この TAC キレーターは K<sup>+</sup>とミリ秒オーダーの速さで結合・解離し、

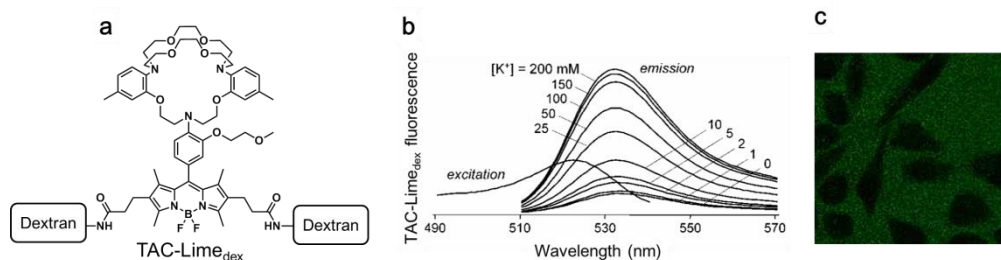
解離定数は 20 mM 前後と、5-20 mM 程度とされる細胞外  $K^+$  濃度の変化を検出するのに適した特性を持つため、細胞外  $K^+$  の蛍光イメージングに適用が可能である。実際に Verkman らはこれらを用いて、マウス的大脑皮質における  $K^+$  wave の観察やマウス気管表面の ASL (Airway Surface Liquid; 気道液層) における  $K^+$  濃度の測定を行っている。



**Figure 1-2-4.** The structure of PBFI.



**Figure 1-2-5.** Schematic image of G-quadruplex based  $K^+$  probe.



**Figure 1-2-6.** Structure and optical properties of TAC-Lime<sub>dex</sub><sup>30</sup>. (a) The structure of TAC-Lime<sub>dex</sub>. (b) Fluorescent excitation and emission spectra of TAC-Lime<sub>dex</sub> in HEPES buffer containing  $K^+$  with the combined  $K^+$  and  $Na^+$  concentration equal to 200 mM. Reprinted with permission from (*J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130 (25), 7794–7795). Copyright (2008) American Chemical Society. (c) Confocal microscopic image of HeLa cells loaded with 10  $\mu$ M TAC-Lime<sub>dex</sub>.

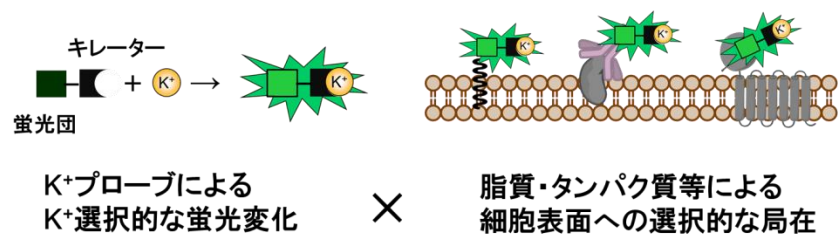
### 第三節 本研究の目的と方針

第二節において様々な  $K^+$ 検出法について述べたが、 $K^+$ を直接観察できるのは  $K^+$ 選択的電極または  $K^+$ プローブの 2 種類のみである。さらに、 $K^+$ 選択的電極を用いる手法は感度が高い一方で非常に侵襲的かつ高度な技術を要するものであり、空間的な情報も得られないため生体サンプルでの利用には適さない。そのため、 $K^+$ の関わる生命現象の研究においては、簡便な操作で高感度な検出を可能とする  $K^+$ プローブの更なる発展が望まれる。

第二節で詳述したように、近年になって細胞外  $K^+$ イメージングのための  $K^+$ プローブがいくつか報告されている。これらは  $K^+$ の時空間的な動態について新たな知見をもたらすものであるが、細胞外液全体に滞留するという性質上、その適応には限界がある。例えば、仮に細胞外液に  $K^+$ が存在しない状態でも OFF 状態の  $K^+$ プローブ由来の蛍光は完全に ON になった時の 10%ほど存在する (Figure 1-2-6 (b))。そのため、細胞外液に存在する  $K^+$ プローブの量が多いほどバックグラウンド蛍光が上昇することは避けられず、微小な  $K^+$ 濃度変化の検出は難しい。また、特定の細胞の近傍における  $K^+$ 濃度変化のより詳細な解析も困難と考えられる。

その一方で、第一節で述べたように、何らかの生体イベントに伴って  $K^+$ が  $K^+$ チャネルや  $K^+$ ポンプの働きによって細胞の内外を行き来する際、最も重要なのは観察対象とする細胞が「ある時点でどの程度の  $K^+$ 濃度に晒されているか」である。特に細胞の表面における  $K^+$ の微小な増減が当該の細胞のふるまいに大きく影響を与えるといえるが、そのような  $K^+$ の動態観察のためには、標的の細胞の表面に高度に局在を制御された  $K^+$ プローブを用いることが理想的といえる。そのような  $K^+$ プローブが開発できれば、将来的には例えば第一節で述べた神経ネットワークや血管平滑筋など、 $K^+$ が重要な役割を担うとされる部分における局所的  $K^+$ 動態を直接観察することで、新たな洞察を得ることも可能になると考えられる。

以上の背景を踏まえて、本研究では細胞外、特に細胞表面における  $K^+$  の時空間的な挙動を簡便かつ高感度に検出する新たな測定手法の開発とその応用を目指した。具体的には、局在を担う構造としてタンパク質や脂質等の担体を利用することで、細胞膜上に  $K^+$  選択的な蛍光プローブを局在させ、細胞周辺の局所的な  $[K^+]$  変化を蛍光変化として検出することを目標とした (Figure 1-3-1)。またそのような測定法の開発によって、細胞系、また将来的には組織レベルでの細胞膜近傍  $K^+$  イメージングへの適用を目指した。



**Figure 1-3-1.** Design of  $K^+$  probe working on cellular membrane.

## 第二章

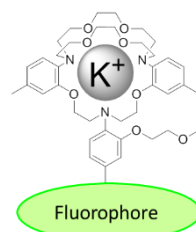
# 細胞膜局在型 $K^+$ プロローブの 設計と開発

## 第二章 細胞膜局在型 K<sup>+</sup>プローブの設計と開発

### 第一節 細胞膜へ局在させる K<sup>+</sup>プローブの選択

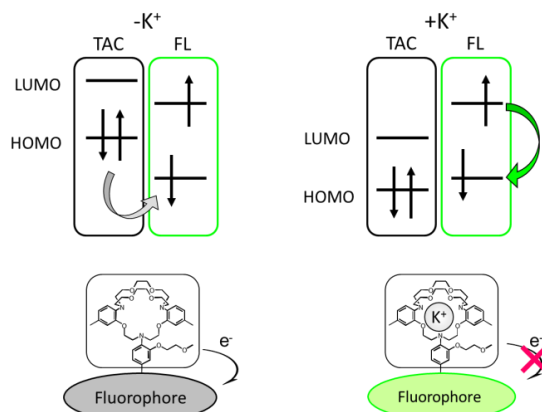
本研究において構造修飾の基盤として用いる K<sup>+</sup>プローブには、高い水溶性、高い蛍光量子収率、5-20 mM の濃度域における K<sup>+</sup>選択的な蛍光上昇、構造修飾が可能な部分構造を持つことなどの条件が求められる。第一章で述べたようにいくつかの K<sup>+</sup>プローブが報告されているものの、上記の条件を十分満たすものはないと判断し、まずこれを探索した。

K<sup>+</sup>の認識部位としては、先行文献で K<sup>+</sup>に対するミリ秒オーダーの早い応答性と高い選択性が報告されている triazacryptand (TAC) キレーター構造を採用した<sup>25</sup> (Figure 2-1-1)。



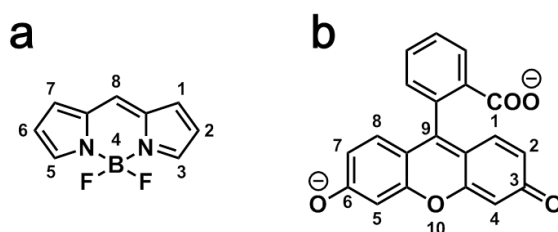
**Figure 2-1-1.** The structure of triazacryptand (TAC) chelator.

蛍光の制御原理には、金属イオン検出蛍光プローブにおいて汎用される Photo induced electron Transfer (PeT) 現象を採用した<sup>32</sup>。Figure 2-1-2 に示すように、電子的に独立したキレーターと蛍光団との間で、金属イオン非存在下では励起状態の蛍光団へキレーターから一電子が移動することによって蛍光が消光される一方、金属イオン存在下では金属イオンがキレーターへ配位することでキレーターの HOMO エネルギーレベルが低下し、励起状態の蛍光団への一電子移動が起こらないために消光が解除され蛍光性が回復する。



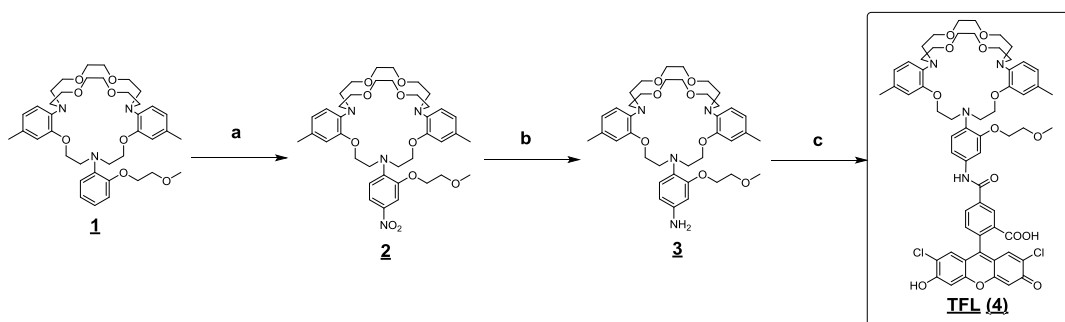
**Figure 2-1-2.** Schematic illustration of the mechanism of PeT (Photo-induced electron Transfer) regulation.

蛍光母核には BODIPY および fluorescein を採用した (Figure 2-1-3)。BODIPY 類は高いモル吸光係数と蛍光量子収率、pH 非依存性、光化学的安定性などの特長によって蛍光イメージングのツールとして汎用されている色素である<sup>33,34</sup>。蛍光団の各部位への化学的修飾と、それに伴う光学特性の変化等に関しても盛んに研究されており、膜局在部位の導入も行いやすいと考えた。また fluorescein は同様に高いモル吸光係数と蛍光量子収率を示し、フェノール性ヒドロキシ基を持った親水性の色素であり、9 位ベンゼン環のカルボキシ基を修飾することで膜局在部位を導入できると考えた。

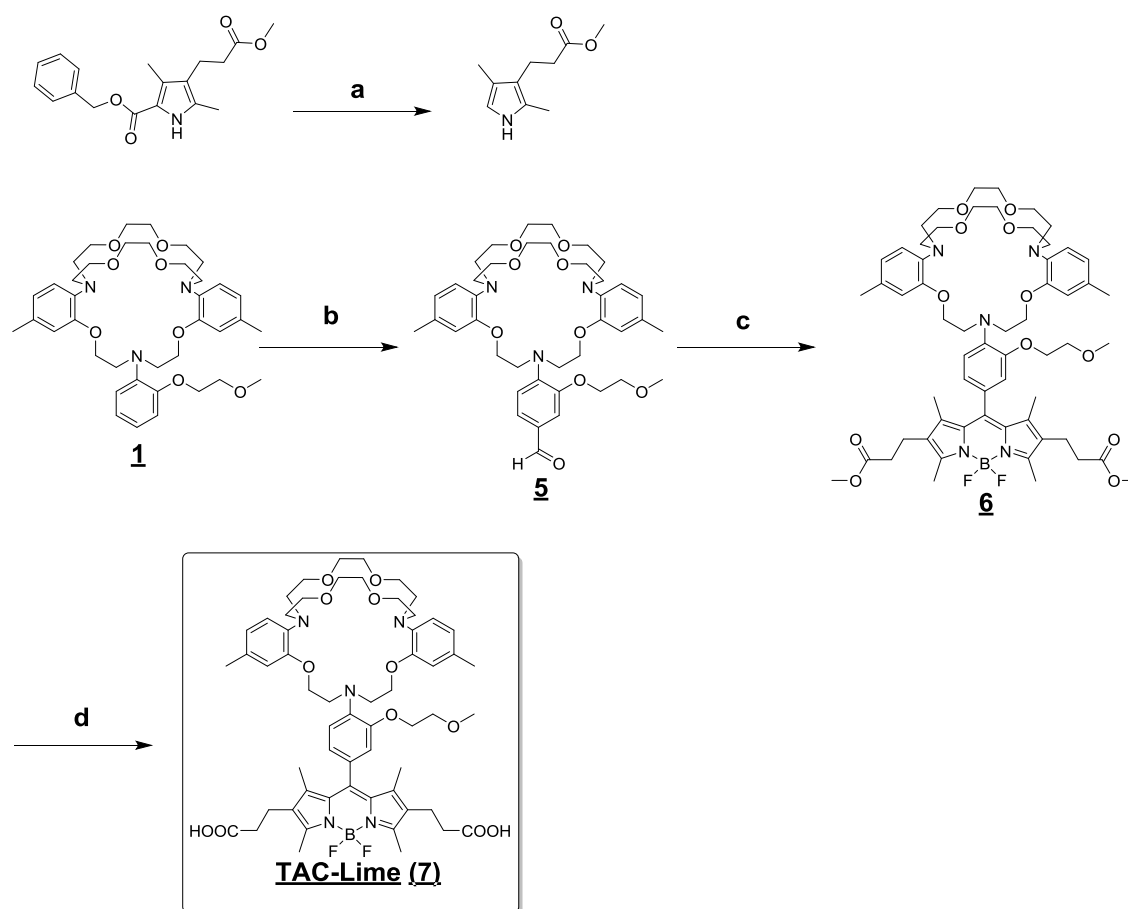


**Figure 2-1-3.** The structure of BODIPY (a) and fluorescein (b).

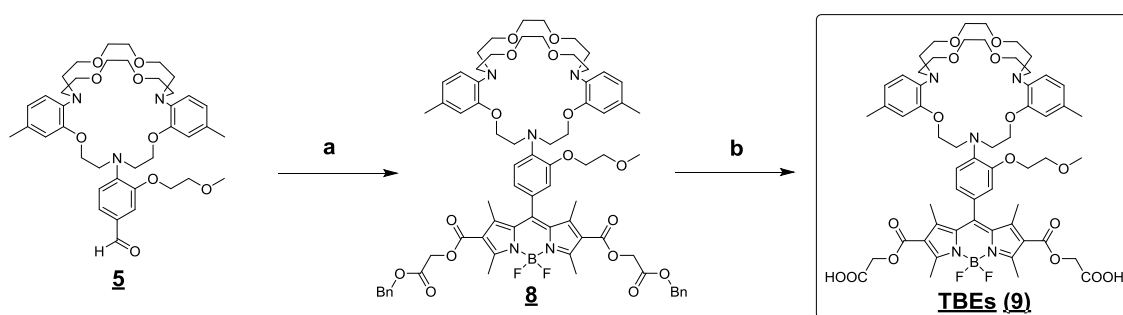
具体的には以下の 3 種について検討した。各々の合成スキームおよび光学特性を以下に示す。なお TAC-Lime は先行論文においてデキストラン結合体の K<sup>+</sup>応答性のみが報告されていたため<sup>30</sup>、TAC-Lime 単体を実際に合成し、構造修飾可能なカルボキシ基を有した状態での光学特性を評価した。



**Scheme 2-1-1.** Synthesis of TFL. (a) HNO<sub>3</sub> aq., H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> aq., AcOH y. 43% (b) H<sub>2</sub>, 10% Pd/C, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y. 54% (c) 2',7'-dichloro-5-carboxyfluorescein, HATU, DIEA, DMF y. 14%



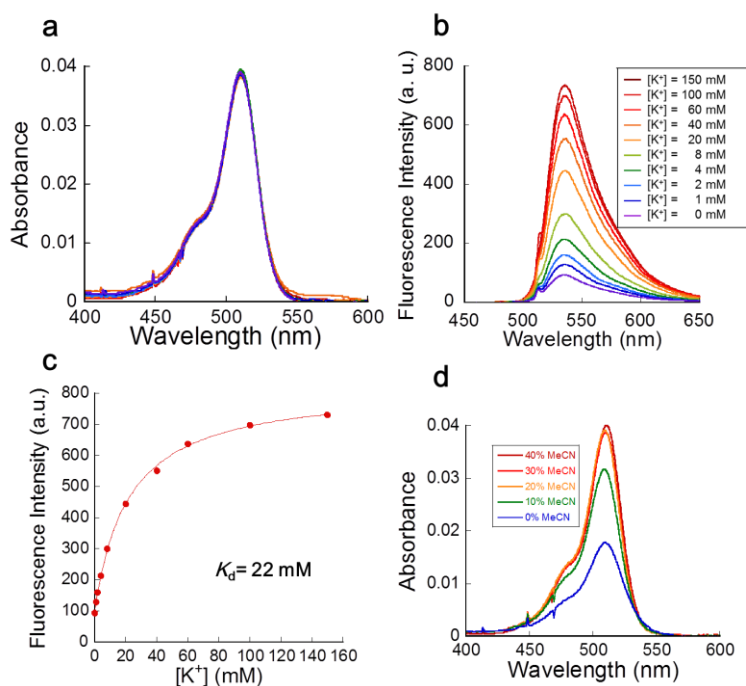
**Scheme 2-1-2.** Synthesis of TAC-Lime. (a) (i)  $\text{H}_2$ , 10% Pd/C, acetone (ii) TFA, 74% (b)  $\text{POCl}_3$ , DMF y. quant. (c) (i) methyl 3-(2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-yl)propanoate, TFA,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (ii) *p*-chloranil,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (iii)  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ , DIEA, toluene y. 18% (d) NaOH,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , MeOH,  $\text{H}_2\text{O}$  y. 86%



**Scheme 2-1-3.** Synthesis of TBEs. (a) (i) 2-(benzyloxy)-2-oxoethyl 2,4-dimethyl-2*H*-pyrrole-3-carboxylate, TFA,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (ii) DDQ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (iii)  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ , DIEA, toluene y. 31% (d) NaOH, MeOH y. 40%



高い親水性を期待して合成した fluorescein を蛍光団に持つ TFL は、HEPES 緩衝液とアセトニトリルの混合溶媒中では良好な  $K^+$  応答性を見せた (Figure 2-1-1(a-c), Table 2-1-1)。しかしながら、期待に反して緩衝液への溶解性は悪く、十分に溶解するのに体積比 20%程度のアセトニトリルを必要とし (Figure 2-1-1 (d))、緩衝液中では吸収・蛍光共にスペクトルが安定せず、 $K^+$  プローブとしての評価は困難であった。キレーター部分の疎水性が高いことから、アニオン性置換基を持つ fluorescein を蛍光団に持つ場合には水中で凝集しやすくなる可能性が考えられる。更に親水性置換基であるカルボキシ基を膜局在部位との結合に用いてしまうと、緩衝液中での  $K^+$  プローブとしての利用は困難と考えられたため、これ以上の検討は行わなかった。

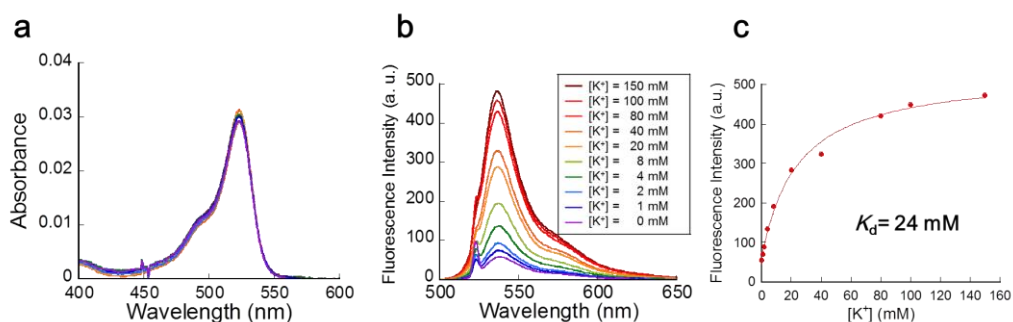


**Figure 2-1-1.** (a) Absorption and (b) emission spectra of 1 μM TFL in 5 mM HEPES buffer (pH 7.0) / MeCN = 60 / 40 containing 1% DMSO as a cosolvent and indicated concentrations of  $K^+$  as the  $ClO_4^-$  salt. Ionic strength was maintained at 150 mM by addition of  $NaClO_4$ . (c) Fluorescence intensity of TFL as a function of  $K^+$  concentration. (d) Absorption spectra of 1 μM TFL in 5 mM HEPES buffer (pH 7.0) containing 8 mM  $K^+$  as the  $ClO_4^-$  salt and indicated percentages of MeCN. The solutions contained 1% DMSO as a cosolvent.

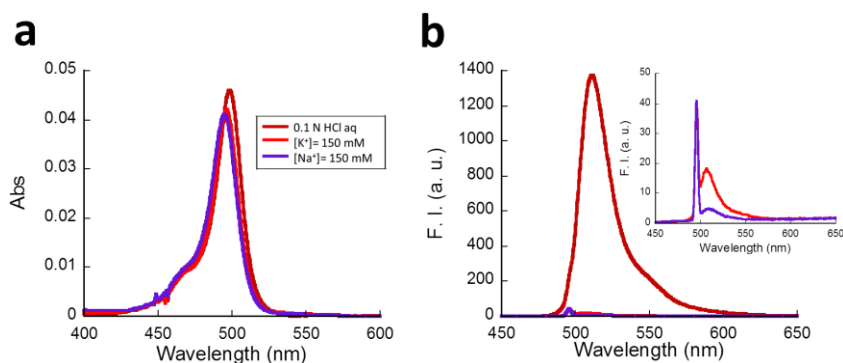
**Table 2-1-1.** Optical properties of TFL.

	[K <sup>+</sup> ]	Abs $\lambda_{\max}$ (nm)	Em $\lambda_{\max}$ (nm)	Quantum Yield
TFL	0 mM	511	535	0.10
	150 mM	511	535	0.84

続いて、BODIPY を蛍光団に持つ TAC-Lime および TBEs の光学特性を示す。



**Figure 2-1-2.** (a) Absorption and (b) emission ( $\lambda_{\text{ex}} = 522$  nm) spectra of 1  $\mu\text{M}$  TAC-Lime in 5 mM HEPES buffer (pH 7.0) containing indicated [K<sup>+</sup>] and 1% DMSO as a cosolvent. Ionic strength was maintained at 150 mM by addition of NaCl. (c) Fluorescence intensity of TAC-Lime as a function of K<sup>+</sup> concentration.



**Figure 2-1-3.** (a) Absorption and (b) emission ( $\lambda_{\text{ex}} = 522$  nm) spectra of 1  $\mu\text{M}$  TBEs in 0.1 N HCl or 5 mM HEPES buffer (pH 7.0) containing indicated [Na<sup>+</sup>] or [K<sup>+</sup>] and 1% DMSO as a cosolvent.

**Table 2-1-1.** Optical properties of K<sup>+</sup> probe.

		Abs $\lambda_{\max}$ (nm)	Em $\lambda_{\max}$ (nm)	Quantum Yield
TAC-Lime	[Na <sup>+</sup> ] = 150 mM	522	538	0.049
	[K <sup>+</sup> ] = 150 mM	522	535	0.28
TBEs	[Na <sup>+</sup> ] = 150 mM	495	508	0.003
	[K <sup>+</sup> ] = 150 mM	497	509	0.009

合成した 2 つのプローブはともに HEPES 緩衝液に対して良好な溶解性を示し、 $K^+$ 濃度の増加に応じて蛍光が増大した (Figure 2-1-2, 2-1-3, Table 2-1-1)。BODIPY の 2,6 位に電子供与性の propionic acid 構造を持つ TAC-Lime は、HEPES 緩衝液中で良好な  $K^+$ 選択性と最大 6 倍程度の蛍光上昇を示し、解離定数が 24 mM と、細胞膜近傍で起こっているとされる 5-20 mM の濃度域での検出に適した性質を備えていた。TAC-Lime 単体は最大蛍光量子収率が 0.28 と良好な値を示したが (Table 2-1-1)、文献に従ってデキストランと結合させたところ最大蛍光量子収率が 0.054 と大きく減少した。

一方、バックグラウンドの抑制による検出感度の上昇を期待し、より PeT による消光が起こりやすいよう 2,6 位に電子求引性のエステル結合を導入<sup>35</sup>した TBEs も合成したが、こちらは  $K^+$ 添加に伴う蛍光量子収率の変化が 0.003 から 0.009 とバックグラウンド蛍光は抑制されたものの  $K^+$ 添加後も 3 倍程度の上昇に留まった。0.1 N HCl 水溶液中では強蛍光性を示したことから、 $K^+$ の配位では十分に PeT が解消されていないことが原因と考えている (Figure 2-1-3)。

以上の結果より、今後の検討では TAC-Lime を基盤として合成展開することとした。

## 第二節 細胞膜局在のための手法の選択

続いて、 $K^+$ プローブを細胞膜表面へ局在させる手法について検討を行った。具体的なアプローチとして、以下のようなものが考えられる。

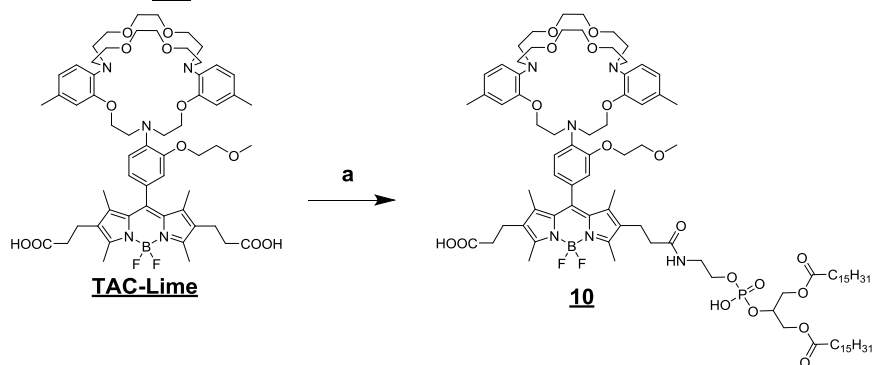
1. 細胞膜非透過性のプローブに対して脂溶性の構造（リン脂質、コレステロール、長鎖脂肪酸等）を結合させ、この部分の細胞膜への親和性を利用して細胞膜上を標識する。
2. 細胞膜表面のタンパク質や糖鎖を特異的に認識するタンパク質（抗体など）にプローブを結合させ、そのタンパク質の細胞膜への集積性を利用して細胞膜表面を染色する。
3. 細胞膜上に発現する足場タンパク質を遺伝子導入し、これと特異的に反応するプローブを負荷する。

これらの各手法について実際に検討を行い、 $K^+$ プローブとしての光学特性が維持でき、かつ細胞膜表面への良好かつ安定な局在を示す手法を探索した。

### 第一項 脂質結合による細胞膜局在

長い炭素鎖などの脂質構造と親水性の構造を蛍光プローブに組み込むことで、小分子プローブを細胞表面に集積させることができる。実際に、これらの構造の導入によって細胞膜近傍における  $Ca^{2+}$  や  $Zn^{2+}$  の濃度変化を検出可能にした有機小分子蛍光プローブが複数報告されている<sup>36,37,38,39</sup>。同手法の利点としては、遺伝子操作を必要とせず操作が簡便なこと、そのため組織など高次の実験系においても試料に特別な操作をせず適用可能なこと、細胞膜上に多量のプローブが存在できるため大きなシグナルが得られることなどがあげられる。しかし一方で、脂質構造を持つプローブの凝集性が高いこと、細胞膜へ集積したプローブもエンドサイトーシスやフリップ・フロップによって短時間で細胞内へ取り込まれること、細胞種に応じた選択性が出せないこと、洗浄操作によって除かれやすいことなどが懸念される。

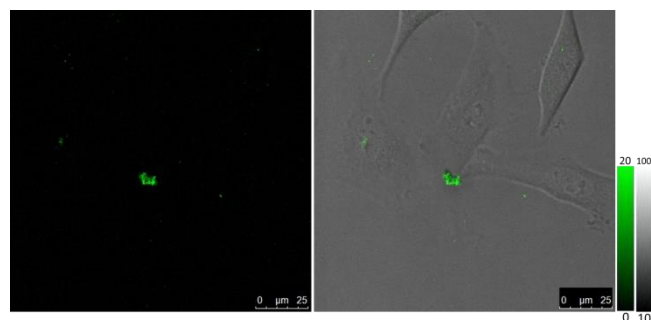
当研究室の大崎らは、fluorescein を蛍光団として各種の脂質と結合させた場合、リン脂質 (DPPE, L- $\alpha$ -Dipalmitoylphosphatidylethanolamine) を結合させたものが最も良好な細胞膜局在性を見せたと報告している<sup>40</sup>。この知見に基づき、TAC-Lime を DPPE に結合させた K<sup>+</sup>プローブ **10** を設計・合成した。



**Scheme 2-2-1-1.** Synthesis of **10**. (a) (i) DMT-MM, DMF (ii) L- $\alpha$ -Phosphatidylethanolamine dipalmitoyl, DIEA, dichloromethane:MeOH = 1:1, y. 15%

この **10** を HeLa 細胞に対し負荷したところ、想定した細胞膜への局在は見られず、蛍光像・明視野像において 5-10  $\mu\text{m}$  程度の大きさの粒（緑色蛍光あり）が見られた (Figure2-2-1-1)。K<sup>+</sup>の添加によっても目立った変化はなかった。これは母核とした TACLime の K<sup>+</sup>キレーター部位や蛍光団が DAF 等の場合と比べて高い疎水性を持つことで、水溶液中で十分に分散せず凝集してしまったためと考えられる。凝集を防ぎ、細胞膜へ負荷することを目的として、非イオン性界面活性剤の pluronic F-127 を 0.03% 添加、10% FBS を含む DMEM を用いる、濃度を 3  $\mu\text{M}$  に減らすなどの条件でイメージングを行ったが、いずれも同様の結果であった。

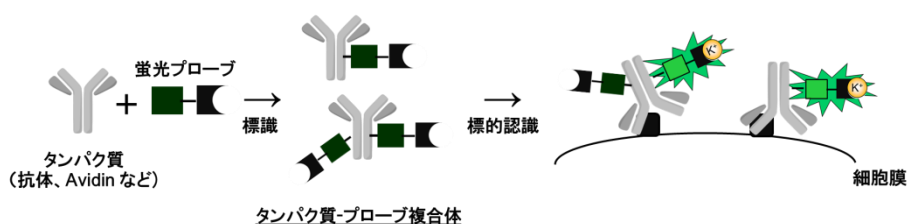
このように、今回の K<sup>+</sup>プローブを母核とした場合には、脂質結合後の物性の予測・制御が難しく最適な方法ではないことが示唆された。



**Figure 2-2-1-1.** Confocal microscopic images of HeLa cells incubated with 15  $\mu$ M 10 at 25 °C for 10 min. Imaging was performed in HBSS. Green:  $\lambda_{Ex}$ = 522 nm,  $\lambda_{Em}$ = 530-600 nm, HyD, gain= 100. BF: gain= 500. Scale bar: 25  $\mu$ m

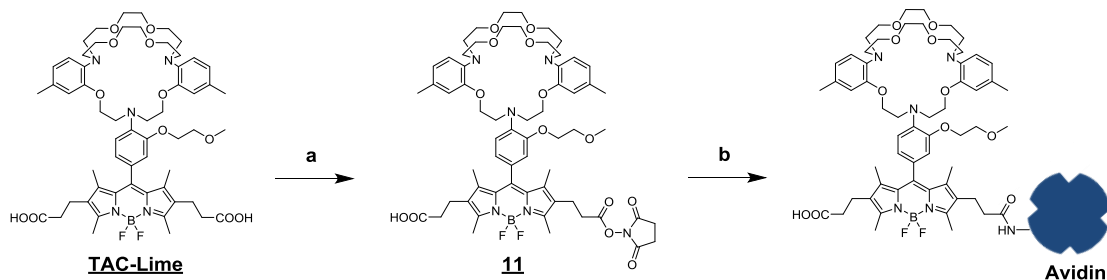
## 第二項 細胞膜結合型タンパク質の利用

細胞膜表面のタンパク質や糖鎖を特異的に認識するタンパク質としては、例えば EGFR に特異的に結合する Herceptin などの抗体や、がん細胞の表面の糖鎖認識タンパク質と結合する糖鎖を表面に持つ avidin などの例が知られている (Figure 2-2-2-1)。これらを蛍光色素や pH センサーで標識し、細胞膜表面に結合させて内在化させることでがん細胞選択的な蛍光イメージングを行ったという報告がなされている<sup>41,42,43,44</sup>。同手法は目的の細胞に対する高い選択性と強い結合力が得られる、遺伝子操作によらずに細胞種を選択性が得られるなどの利点が考えられるが、各種タンパク質の標識に伴ってプローブの蛍光特性が悪化してしまう可能性もある。そこで、実際に複合体を作成し、その光学特性の変化の程度について検討した。



**Figure 2-2-2-1.** Schematic image of membranelocalization of  $K^+$  probe-protein complex.

一般に抗体は高い選択性と結合力を持つ一方で非常に高価であり予備的な検討を行うには不適と考え、ここでは avidin をモデルタンパク質として利用した。実際に TAC-Lime の mono succinimide 体を合成し、avidin を標識することで細胞膜の染色が可能であるかを検討した。細胞種は avidin が結合するという報告のある HT29 を用いた<sup>43</sup>。



**Scheme 2-2-2-1.** Synthesis of Avidin-TAC-Lime conjugate. (a) NHS, WSCD, DIEA, DMF y. 24% (b) avidin, 0.1N  $Na_2HPO_4$  aq., DMSO

**Table 2-2-2-1** Optical properties of avidin-TAC-Lime conjugate

	Abs	Em	Quantum
	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\lambda_{\max}$ (nm)	Yield
Avidin-TAC-Lime conjugate	[Na <sup>+</sup> ] = 150 mM 525	537	0.003
	[K <sup>+</sup> ] = 150 mM 525	539	0.011

吸収スペクトル(Figure 2-2-2-1)より結合量を見積もったところ、Avidin1 分子に対して、平均 1.4 分子の TAC-Lime が結合していた。しかし Avidin への標識によって TAC-Lime の最大蛍光量子収率は 25 分の 1 程度と著しく減少し (Table 2-2-2-1)、イメージングにおいても細胞膜の明確な染色は観察されなかった。このような蛍光特性の変化は、プローブの標識位置周辺のアミノ酸などによる環境や、個々のアビジン分子に標識されるプローブ数の違いなどに起因すると考えられるため、異なる結合比率・結合アミノ酸を用いることで改善される可能性は否定できない。しかしながら、このようにタンパク質表面のアミノ基等を標識部位として利用する場合、光学特性の変化の予測や結合比の制御は難しく、良好な性質の複合体を安定して作ることは困難となる。

K<sup>+</sup>のような生体サンプルにおける変化量が比較的少なく大きな蛍光増大が必ずしも得られないものを標的とする場合には、光学特性の悪化は検出の難易度を高めてしまうと考えられる。そのため、タンパク質の直接標識の検討は中断し、プローブの結合部位や結合比をより厳密に制御することの出来るタグタンパク質の利用について検討することとした。

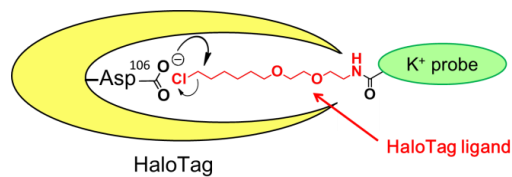


### 第三項 細胞膜へ発現するタグタンパク質に対する in situ 標識

本手法では、近年開発の盛んな「タグタンパク質」を細胞膜局在を担う構造として利用する。タグタンパク質とは特定の化学構造を持った分子と選択的に結合する酵素改変タンパク質であり、標的タンパク質との融合コンストラクトを利用し、適切な化学構造を導入したカラム担体や蛍光分子を利用することで、プルダウンアッセイや生細胞における標的特異的な蛍光染色などを可能とする研究ツールである<sup>45,46,47,48</sup>。このタグタンパク質を細胞膜表面に発現させ、細胞膜非透過性の K<sup>+</sup>プローブで選択的に標識することで、細胞膜上を選択的に K<sup>+</sup>プローブで標識することが出来ると考えた。

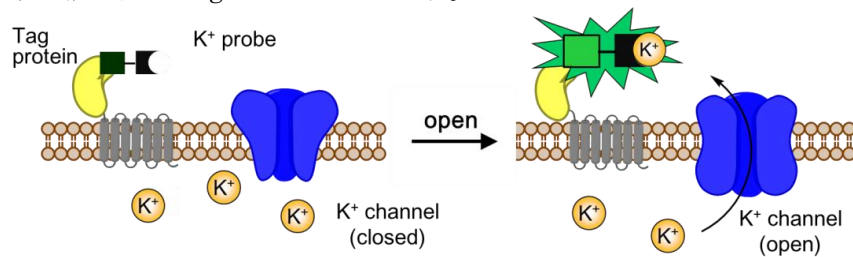
同手法は標的細胞への遺伝子導入によってタグタンパク質の発現場所、量などを厳密に制御でき、またプローブとタンパク質が常に 1:1 の結合比で特定の部位に結合するため、光学特性の維持が期待できる点で優れていると考えられる。実際に、このタグタンパク質を用いて Zn<sup>2+</sup>や Ca<sup>2+</sup>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> などの検出蛍光プローブを様々な細胞小器官へ集積させることに成功したという報告がなされている<sup>49,50,51,52</sup>。

具体的には、タグタンパク質として HaloTag タンパク質を用いた<sup>47</sup>。これは 2005 年に Promega 社によって開発されたもので、ロドコッカス属細菌 (*Rhodococcus rhodochrous*) 由来の haloalkane dehalogenase の遺伝子改変産物である HaloTag タンパク質とクロロアルカン誘導体である HaloTag リガンドとの共有結合を利用したタンパク質標識技術である (Figure 2-2-3-1)。他に汎用されるタグタンパク質である SNAP-tag<sup>45</sup>や CLIP-tag<sup>46</sup>と比べると、HaloTag は 1 オーダー程度結合速度が速く、また HaloTag が細胞膜外側に露出するような様々な GPCR との融合タンパク質が市販され、かずさ DNA 研究所から手に入ること、またリガンド構造に核酸を含むこれらのタグタンパク質と比べて合成時の扱いがより容易であることなどの特長があり、今回の目的により適していると考えて選択した。



**Figure 2-2-3-1.** Schematic image of HaloTag technology.

目指す測定系の概念図を Figure2-2-3-2 に示す。



**Figure 2-2-3-2.** Design of the system for detecting K<sup>+</sup> channel activity.

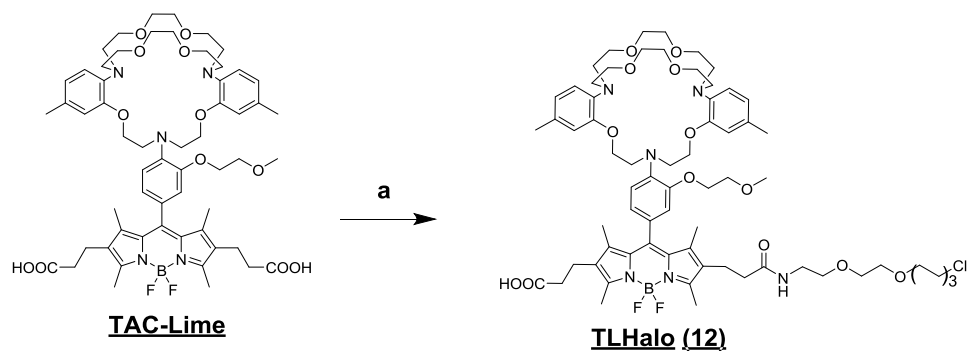
Figure2-3-2-2 のような系の実現には、以下の特性を備えた K<sup>+</sup>プローブの開発が必要となる。

- A. 生理的な条件下、K<sup>+</sup>に選択的に応答して蛍光を発する
- B. HaloTag タンパク質と結合する部分構造を持つ
- C. タンパク質との結合後も蛍光特性が維持される
- D. 高い水溶性をもち、細胞膜を透過しない

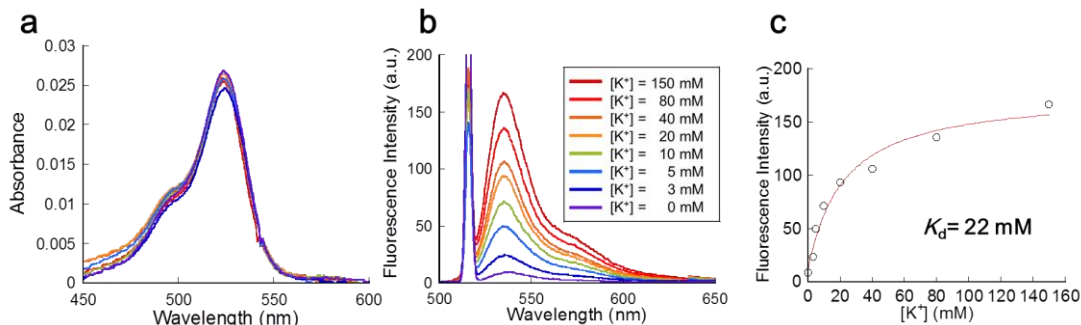
A については、TAC-Lime の光学特性を出来る限り維持できればよい。そこでまず、TAC-Lime を母核として、HaloTag ligand 構造を持ち (B)、かつタンパク質との結合後も蛍光特性を維持できる (C) K<sup>+</sup>プローブの開発を試みた。

### 第三節 K<sup>+</sup>応答性 HaloTag ligand の設計・合成と評価

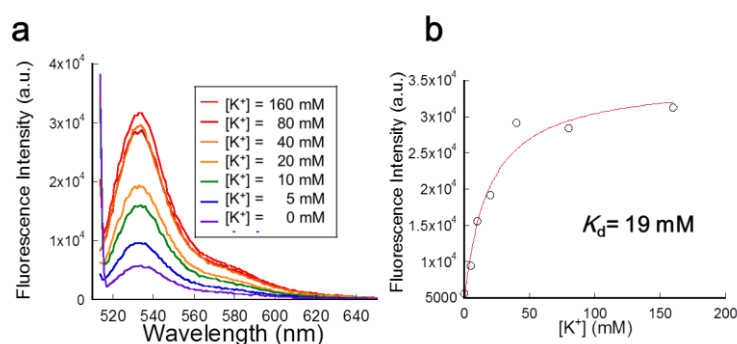
TACLime に HaloTag ligand 構造を付与した K<sup>+</sup>プローブ TLHalo を設計・合成し、その単体および大腸菌を用いて発現・精製した HaloTag タンパク質との複合体の光学特性を検討した (Scheme 2-3-1, Figure 2-3-1, 2-3-2, Table 2-3-1)。



**Scheme 2-3-1.** Synthesis of TLHalo. (a) DMT-MM, DIEA, HaloTag® Amine (O2) Ligand, DMF y. 8.8%



**Figure 2-3-1.** (a) Absorption and (b) emission ( $\lambda_{\text{ex}} = 515 \text{ nm}$ ) spectra of  $1 \mu\text{M}$  TLHalo in  $5 \text{ mM}$  HEPES buffer (pH 7.0) containing indicated  $[\text{K}^+]$  and 1% DMSO as a cosolvent. Ionic strength was maintained at  $150 \text{ mM}$  by addition of NaCl. (c) Fluorescence intensity as a function of  $\text{K}^+$  concentration.



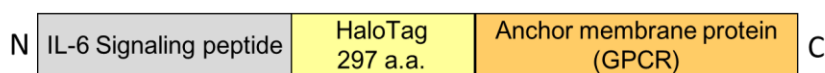
**Figure 2-3-2.** (a) Emission ( $\lambda_{\text{ex}} = 490$  nm) spectra of 1  $\mu\text{M}$  HaloTag-TLHalo complex in PBS containing indicated  $[\text{K}^+]$ . (b) Fluorescence intensity as a function of  $\text{K}^+$  concentration.

**Table 2-3-1.** Optical properties of TLHalo and HaloTag-TLHalo conjugate.

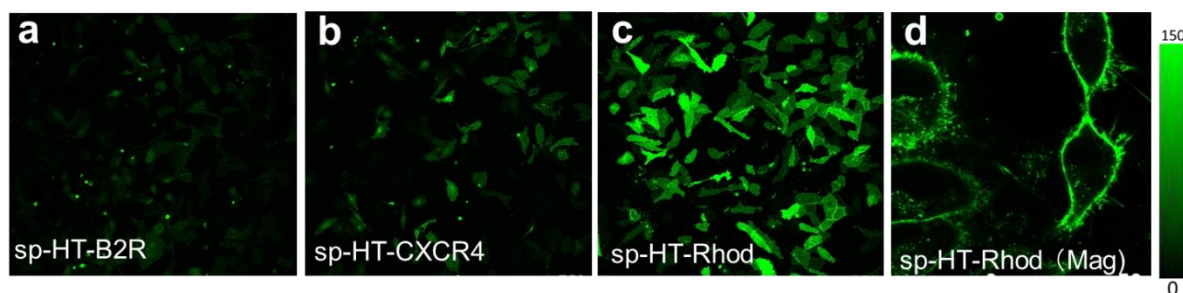
		Abs	Em	Quantum
		$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	Yield
TLHalo	$[\text{Na}^+] = 150$ mM	525	538	0.015
	$[\text{K}^+] = 150$ mM	525	535	0.28
HaloTag-TLHalo conjugate	$[\text{Na}^+] = 150$ mM	525	538	0.033
	$[\text{K}^+] = 150$ mM	525	535	0.22

TLHalo は TAC-Lime とほぼ同様の光学特性を示した。また HaloTag タンパク質との結合によって TLhalo の蛍光量子収率の最大値は 20%程度減少したものの、avidin の直接標識の場合と比べれば良好な蛍光量子収率を保持していた。以上より、TLHalo は生理的な条件下、タンパク質との結合後も  $\text{K}^+$  に選択的に応答して蛍光を発するという 4 つの条件のうち A・C の 3 つを十分に満たす  $\text{K}^+$  プローブであることが示された。そこで、残る条件である「高い水溶性をもち、細胞膜を透過しない (D)」ことを満たすかについて検討を行った。

まず評価系として、細胞膜表面に HaloTag タンパク質を発現した細胞の作製を行った。かずさ DNA 研究所の長瀬隆弘博士から頂いた、7 回膜貫通型の G タンパク質共役型受容体であるヒト rhodopsin の N 末端に IL-6 由来の細胞膜移行シグナル (sp; signaling peptide) と HaloTag タンパク質を組み込んだ融合タンパク質 (sp-HT-Rhod)、および GPCR 部分をブライキニン受容体 2 型 (B2R) またはケモカイン受容体の一種である CXCR4 に組み替えた sp-HT-B2R、sp-HT-CXCR4 を HeLa 細胞に遺伝子導入し、これら 3 種の発現量と局在を評価した(Figure 2-3-3, 2-3-4)。



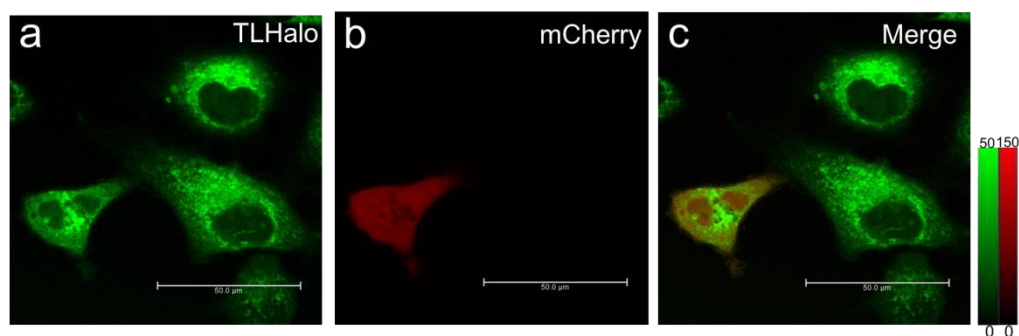
**Figure 2-3-3.** Construct of plasma membrane-localized HaloTag protein.



**Figure 2-3-4.** Confocal microscopic images of HeLa cells transfected with sp-HT-B2R (a), CXCR4 (b) or Rhodopsin (c, d). The cells were labeled with 1  $\mu$ M Alexa488halo.  $\lambda_{\text{ex}}$  = 488 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 500-600 nm.

細胞膜を透過せず、細胞膜外側に発現した HaloTag タンパク質のみを染色する HaloTag リガンドとして Promega 社より販売されている Alexa 488 halo Ligand を用いてこの細胞を染色したところ遺伝子導入された細胞の細胞膜上で強い緑色蛍光が観察された(Figure 2-3-8)。すなわち、これら 3 種の HaloTag 融合タンパク質は全て細胞膜上に外側を向いて十分量発現していることがわかる。このうち、最も発現量の多かった sp-HT-Rhod を今後の検討に用いることとした。

続いて、TLHalo を用いて染色を行った (Figure 2-3-5)。なお、sp-HT-Rhod 発現細胞のマーカーとして mCherry を同時に遺伝子導入している。

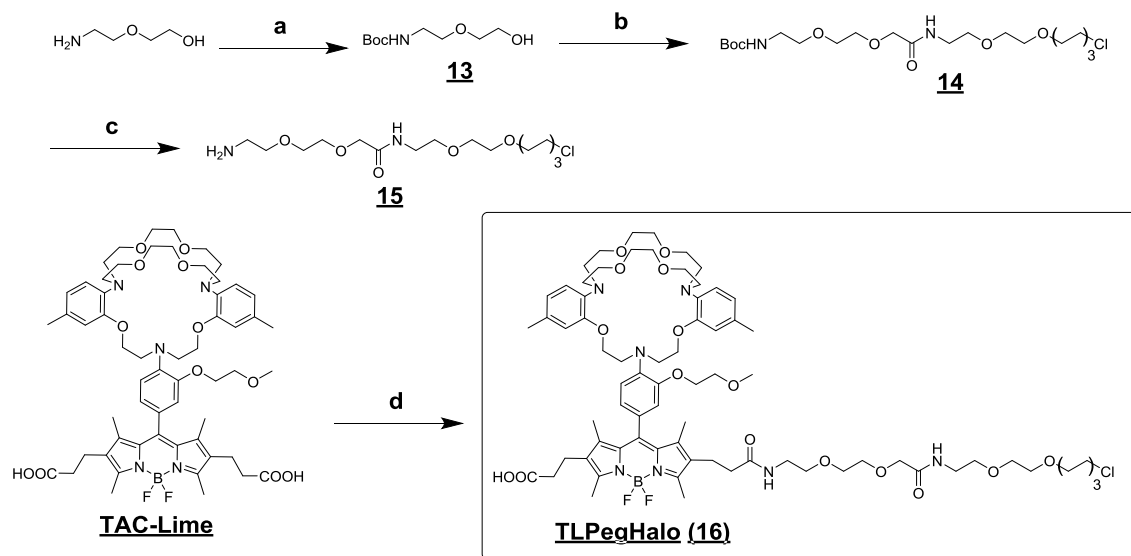


**Figure 2-3-5.** Confocal microscopic images of HeLa cells transfected with SP-HT-Rhod and mCherry. The cells were labeled with 10  $\mu$ M TLHalo. (a) TLHalo, (b) mCherry, (c) Merge.  $\lambda_{\text{ex}} = 514 \text{ nm}, 561 \text{ nm} : \lambda_{\text{em}} = 530\text{-}560 \text{ nm}, 580\text{-}680 \text{ nm}$ . Scale bar: 50  $\mu$ m

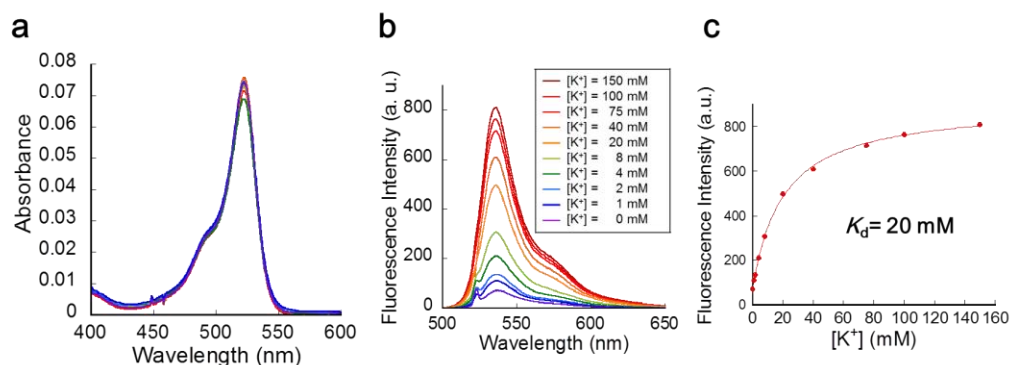
その結果、TLHalo は期待に反して細胞膜を透過し、HaloTag タンパク質の発現の有無に関わらず細胞内を非特異的に染色してしまった。また細胞を 4% PFA で固定し界面活性剤で細胞膜の透過処理を施したところ、この細胞内の緑色蛍光は消失し細胞膜上では緑色蛍光は観察されなかった。仮に  $\text{K}^+$ プローブが HaloTag タンパク質と結合していれば、透過処理後に mCherry の赤色蛍光を示す細胞の内部または膜上で緑色蛍光が観察されと考えられる。このことより、TLHalo は HaloTag タンパク質との結合反応をほとんど起こさず、細胞内に蓄積されていくことが示唆された。

以上の結果より、目指す測定法の実現のためには、TLHalo の細胞膜非透過性を向上させる必要がある。また、蛍光団がタンパク質の表面近傍に存在する場合、第二節でみられたような最大蛍光量子収率の低下に加え、PeT による消光の解除やスタッキングによる吸収スペクトルの変化など様々な影響が出ることが知られている。そのため、適切なスペーサー構造の導入は、TLHalo でも軽微ながら見られたようなタンパク質への標識によるプローブの光学特性の変化をより軽減することに繋がると考えられる。

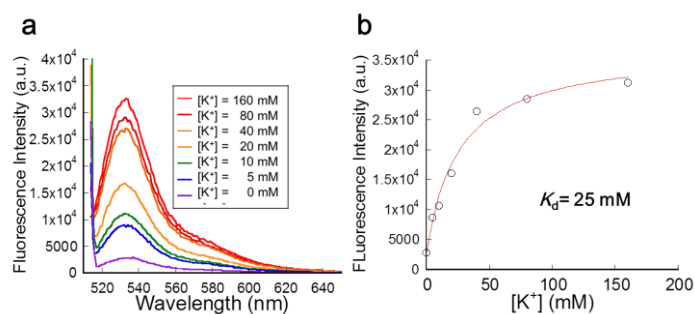
以上の考察を踏まえて、分子全体の親水性の向上により細胞膜非透過性が増すことと、タンパク質表面との距離を取ることで光学特性の変化がより軽微に抑えられることに期待して、TAC-Lime と HaloTag ligand の間にエチレングリコール構造または 2 つのスルホ基を持つペプチド構造のスペーサーを導入した分子を設計・合成し、光学特性および HaloTag タンパク質との結合による影響を精査した (Scheme 2-3-2, 3, Figure 2-3-6, 7, 8, 9, Table 2-3-2, 3)。



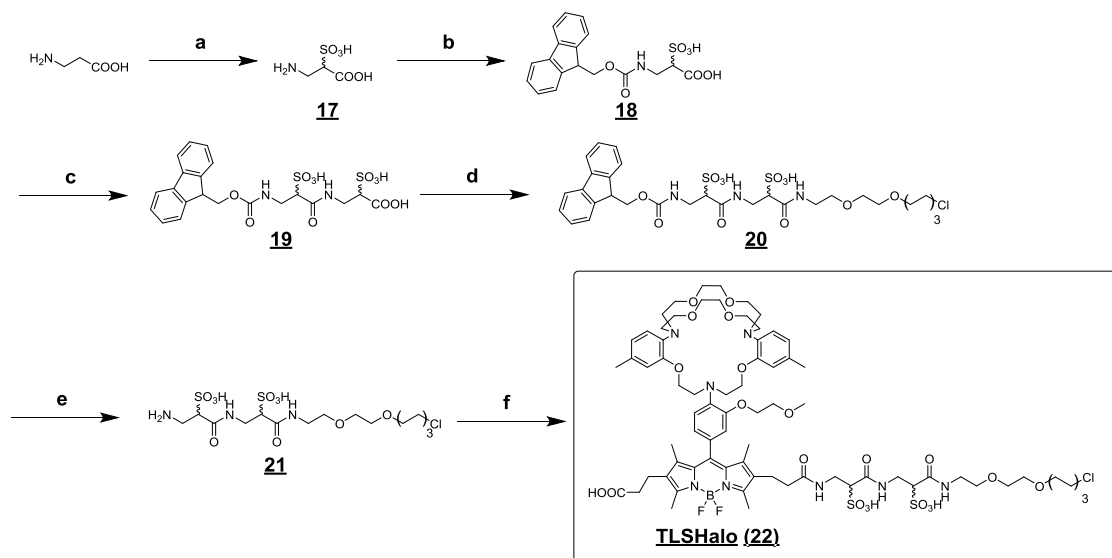
**Scheme 2-3-2.** Synthesis of **TLPEGHalo (16)**. (a)  $\text{Boc}_2\text{O}$ , EtOH y. 93% (b) (i) Sodium 2-iodoacetate, NaH, DMF (ii) NHS, DCC,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (iii) HaloTag® Amine (O2) Ligand, DIEA, DMF y. 21% (c) TFA,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y. 84% (d) TAC-Lime (**15**), TSTU, DIEA, DMF y. 84%.



**Figure 2-3-6.** (a) Absorption and (b) emission ( $\lambda_{\text{ex}} = 522$  nm) spectra of 1  $\mu\text{M}$  **TLPEGHalo** in 5 mM HEPES buffer (pH 7.0) containing indicated  $[\text{K}^+]$  and 1.5% DMSO as a cosolvent. Ionic strength was maintained at 150 mM by addition of NaCl. (c) Fluorescence intensity as a function of  $\text{K}^+$  concentration.

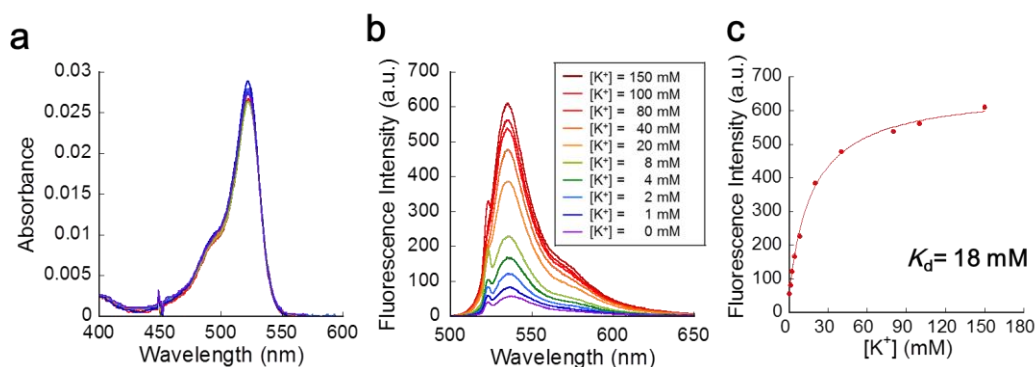


**Figure 2-3-7.** (a) Emission ( $\lambda_{\text{ex}}=490$  nm) spectra of 1  $\mu\text{M}$  HaloTag-TLPegHalo complex in PBS (pH 7.4) containing indicated  $[\text{K}^+]$ . (b) Fluorescence intensity as a function of  $\text{K}^+$  concentration.

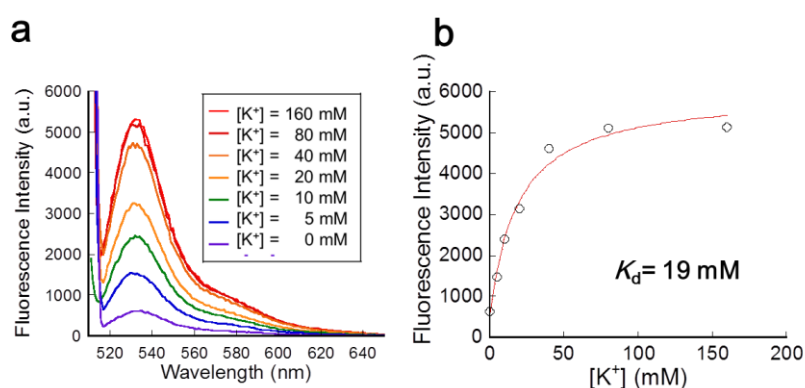


**Scheme 2-3-3.** Synthesis of TLShalo. (a) Oleum (30%  $\text{SO}_3$ ), y. 62% (b) Fmoc-OSu, 8.5%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  aq, 1,4-dioxane, y. 83% (c) (i) NHS, DCC, DMF (ii) **17**, DMF, 6.8%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  aq. y. 64% (d) HaloTag® Amine (O2) Ligand, TSTU, DIEA, DMF y. 20% (e) piperidine, DMF y. 14% (f) TAC-Lime, DMT-MM, DIEA, DMF y. 41%





**Figure 2-3-8.** (a) Absorption and (b) emission ( $\lambda_{\text{ex}} = 522 \text{ nm}$ ) spectra of  $1 \mu\text{M}$  TLSHalo in  $5 \text{ mM}$  HEPES buffer ( $\text{pH } 7.0$ ) containing indicated  $[\text{K}^+]$  and  $1\%$  DMSO as a cosolvent. Ionic strength was maintained at  $150 \text{ mM}$  by addition of  $\text{NaCl}$ . (c) Fluorescence intensity of TLSHalo as a function of  $\text{K}^+$  concentration.



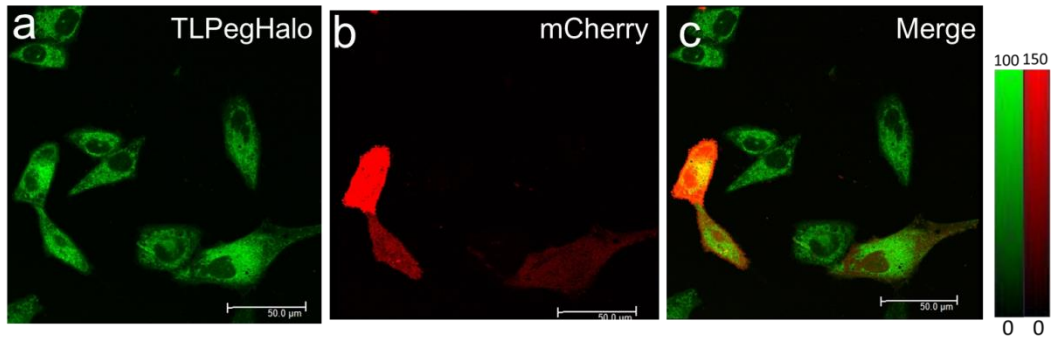
**Figure 2-3-9.** (a) Emission ( $\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$ ) spectra of  $1 \mu\text{M}$  HaloTag-TLSHalo complex in  $\text{PBS}$  ( $\text{pH } 7.4$ ) containing indicated  $[\text{K}^+]$ . (b) Fluorescence intensity as a function of  $\text{K}^+$  concentration.

**Table 2-3-3.** Optical properties of TLPegHalo and TLSHalo.

		Abs $\lambda_{\text{max}} \text{ (nm)}$	Em $\lambda_{\text{max}} \text{ (nm)}$	Quantum Yield
	$[\text{K}^+]$	without / with HaloTag		
TLPegHalo	0 mM	522	538	0.049 / 0.029
	150 mM	522	535	0.41 / 0.33
TLSHalo	0 mM	522	537	0.040 / 0.031
	150 mM	522	535	0.41 / 0.36

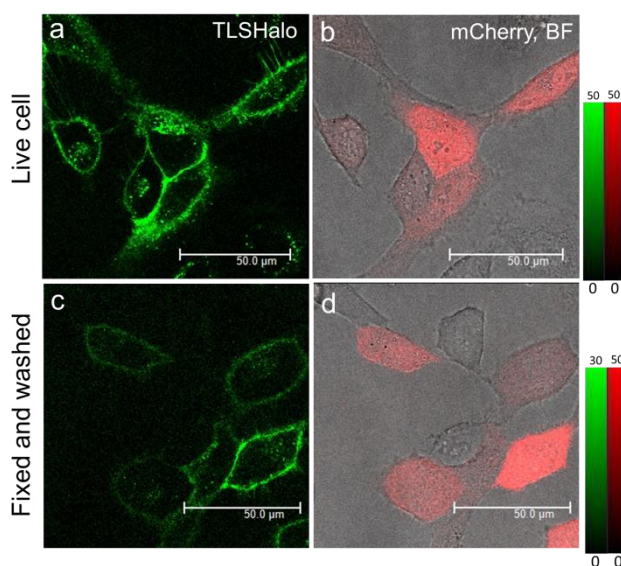
詳細な機構は不明だが、スペーサー構造の導入によって蛍光の伸び率は保たれたまま最大量子収率が TAC-Lime の 1.3 倍程度に上昇した。また HaloTag タンパク質との結合後も、最大蛍光量子収率、 $\text{K}^+$ 添加に伴う蛍光の伸び率ともに TAC-Lime と同等以上の優れた特性を示した (Table 2-1-1 for TAC-Lime, Table 2-3-3 for TLPegHalo and TLSHalo)。

続いて、TLHalo (Figure 2-3-5)と同様に sp-HT-Rhod を発現した HeLa 細胞に対し、TLPegHalo および TLSHalo を用いて染色した (Figure 2-3-10, 2-3-11)。



**Figure 2-3-10.** Confocal microscopic images of HeLa cells transfected with SP-HT-Rhod and mCherry. The cells were labeled with 10  $\mu$ M TLPegHalo. (a) TLPegHalo, (b) mCherry, (c) Merge.  $\lambda_{ex}$ = 522 nm, 586 nm :  $\lambda_{ex}$ = 530-560 nm, 600-695 nm. Scale bar: 50  $\mu$ m

TLPegHalo は期待に反して細胞膜を透過し、HaloTag タンパク質の発現の有無に関わらず細胞内を非特異的に染色してしまった (Figure 2-3-10)。細胞を 4% PFA で固定し、界面活性剤で細胞膜を透過処理するとこの細胞内の緑色蛍光は消失し、細胞膜上では緑色蛍光は観察されなかったことから、TLPegHalo は TLHalo と同様に HaloTag タンパク質との結合反応をほとんど起こさず、細胞内に蓄積されていくことが示唆された。

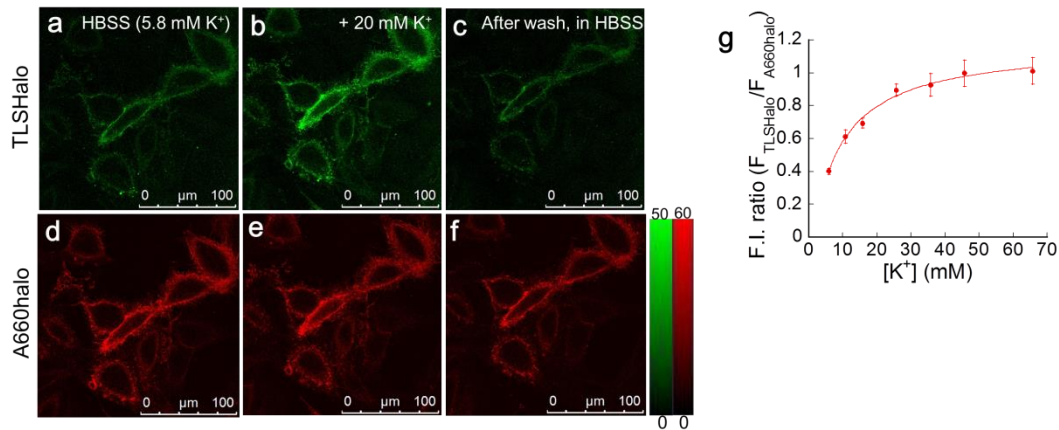


**Figure2-3-11.** Confocal microscopic images of HeLa cells transfected with SP-HT-Rhod and mCherry. The cells were labeled with 10  $\mu$ M TLSHalo. (a)TLSHalo, (b) mCherry and bright field. (c,d) Images after fixed with 4% PFA and permeabilized by PBS including 0.03% TritonX.  $[K^+]$  was 40 mM. (c) TLSHalo, (d) mCherry and bright field.  $\lambda_{ex}$ = 522 nm, 586 nm :  $\lambda_{ex}$ = 530-580 nm, 600-695 nm. Scale bar: 20  $\mu$ m

一方、TLSHalo を負荷した場合には遺伝子導入された HeLa 細胞の細胞膜上のみにおいて緑色蛍光が観測された。PFA 固定および TritonX による細胞膜の透過処理の後も細胞膜上から緑色蛍光が観察され、TLSHalo が HaloTag タンパク質と共有結合を形成していることが示された (Figure 2-3-10)。なお、DMEM 中 37°C で 30 分 TLSHalo を付加する上記の条件下では細胞内の内膜系と思われる部分にわずかな量の緑色の輝点が観察され、またこの輝点は遺伝子導入されていない細胞でも観察された。この細胞内に見られる輝点は 25°C (室温) の条件下、DMEM 中 30 分の条件でプローブを負荷した際には少なくなっており、エンドサイトーシスなどによって能動的に取り込まれていることが示唆された。室温以下の低温で短時間染色することで細胞膜上において十分な蛍光が観察され、評価および利用にあたっては軽微な非特異的取り組みは大きな問題にならないと考え、TLSHalo を用いてさらに検討を進めた。

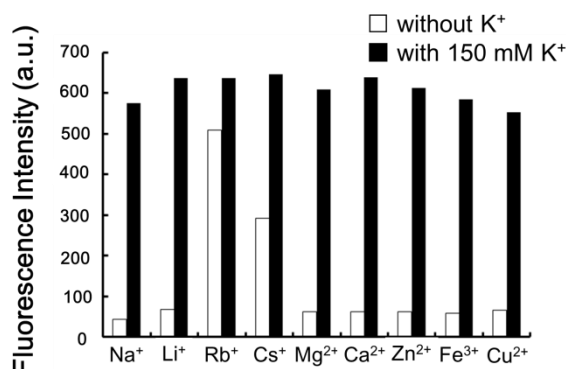
続いて、TLSHalo が細胞表面でもカリウムプローブとして機能するかについて検討した (Figure 2-3-12)。なお蛍光イメージングにおいて TLSHalo の蛍光強度変化のみを測定しようとする、K<sup>+</sup>濃度の変動以外に細胞ごとの HaloTag タンパク質の発現量の違いや時間経過に伴う細胞の伸縮、焦点位置のずれなどの要因によっても興味領域中の蛍光強度は変化しうするため、わずかな蛍光強度の変化を検出することは難しいと考えられる。そこで、測定の信頼性を向上させるため、TLSHalo の負荷時に K<sup>+</sup>非依存性の近赤外蛍光を持つ HaloTag ligand である Alexa660halo を共存させ、細胞膜上の HaloTag タンパク質を競合的に染色した。HaloTag タンパク質は HaloTag ligand と 1:1 で共有結合を形成するため、1 分子レベルでは TLSHalo か Alexa660halo のどちらか一方と結合していることになるが、通常のマクロな撮像条件下では細胞膜上が一定の比率の TLSHalo と Alexa660halo で染色されることになり、Alexa660halo の蛍光を標準として TLSHalo の蛍光との比をとることで先に述べたようなアーチファクトの影響を極力除くことが可能になる。この手法を用い

て、細胞外液の  $K^+$ 濃度を变化させた時の蛍光強度変化を測定したところ、細胞外液の  $K^+$ 濃度変化に伴う細胞膜上の緑色蛍光強度の変化が観察されたことから、TLSHalo は細胞表面においても  $K^+$ プローブとして機能することが確かめられた。



**Figure 2-3-12.** Confocal microscopic images of HeLa cells transfected with sp-HT-Rhod and labeled with 2  $\mu$ M TLSHalo and 10  $\mu$ M Alexa660halo. The images were taken in HBSS containing indicated concentration of  $K^+$ . (a-c) Fluorescence images of TLSHalo in HBSS containing indicated amount of  $K^+$ . (d-f) Fluorescence images of Alexa660halo in HBSS containing indicated amount of  $K^+$ . (g) The ratio of fluorescence intensity ( $F_{TLShalo}/F_{A660halo}$ ) as a function of  $K^+$  concentration. The values were calculated by taking three ROIs on the images. Error bar: S.D. Green:  $\lambda_{ex}$  = 522 nm,  $\lambda_{em}$  = 535-570 nm, gain = 800. Red:  $\lambda_{ex}$  = 660 nm,  $\lambda_{em}$  = 680-800 nm, gain = 800. Scale bar: 100  $\mu$ m

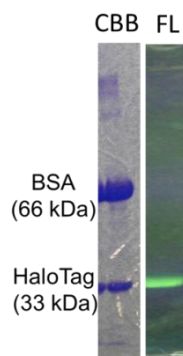
TLSHalo の金属イオン選択性を検討した (Figure 2-3-13)。



**Figure 2-3-13.** Ion selectivity of TLSHalo. Emission spectra were measured with 1  $\mu$ M TLSHalo dissolved in HEPES (pH 7.4) containing 1% DMSO as a cosolvent ( $\lambda_{\text{ex}} = 522$  nm). Concentrations were as follows: Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> 150 mM, Rb<sup>+</sup> and Cs<sup>+</sup> 80 mM, Zn<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> and Cu<sup>2+</sup> 100  $\mu$ M, each as the Cl<sup>-</sup> salt. White bar: without K<sup>+</sup>, black bar: with 150 mM K<sup>+</sup>.

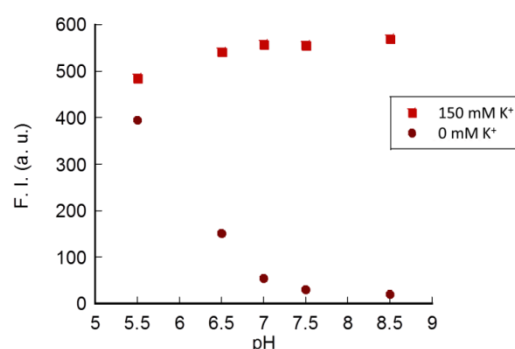
PBS (pH 7.4) 中では、TLSHalo は代表的な金属イオンに対して蛍光上昇を示さなかった。K<sup>+</sup>と同じアルカリ金属で K<sup>+</sup>より原子番号の大きい Rb<sup>+</sup>、Cs<sup>+</sup>に対しては蛍光上昇を示したが、これらは通常測定する生体内の系には一般に存在しないイオンであるため問題ないと考えられる。

また、代表的なタンパク質として BSA との共存下で TLSHalo と HaloTag タンパク質を反応させたところ、TLSHalo は BSA の共存下でも HaloTag タンパク質と選択的に結合した。(Figure 2-3-14)。



**Figure 2-3-14.** SDS-PAGE of HaloTag-TLSHalo conjugate.

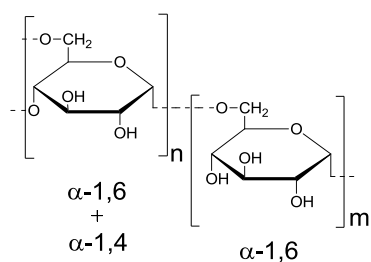
100 mM NaPi buffer を用いて pH 依存性を検討した (Figure 2-3-15)。



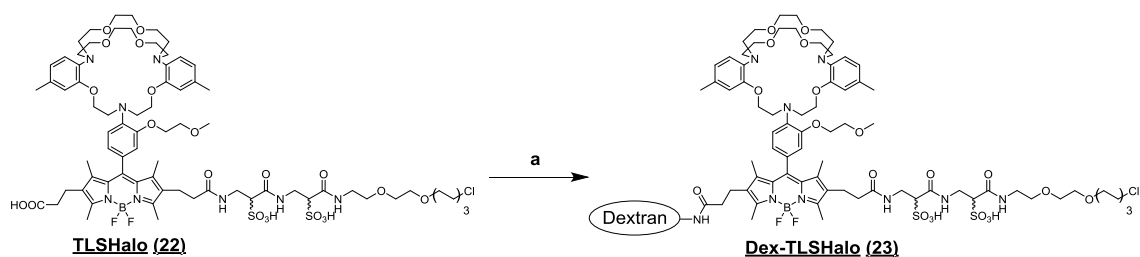
**Figure 2-3-15.** pH dependency of the fluorescence of 1  $\mu$ M TLSHalo. Spectra were measured in 100 mM sodium phosphate buffer adjusted to the indicated pH. The indicated concentration of K<sup>+</sup> was used. The mixture contained 1% DMSO as a cosolvent.

pH が酸性になるにつれて、K<sup>+</sup>が存在しなくても蛍光が上昇した。これは TAC キレーターの窒素原子がプロトン化されることによって PeT による消光が解消されていることが原因と考えられる。当研究室の浅沼らの検討によれば、BODIPY に直接結合しているジエチルアミノベンゼン構造の窒素原子の pK<sub>a</sub> は 6.0 であり<sup>41</sup>、類似の構造である TLSHalo でも pH 7 より酸性側では窒素原子のプロトン化によって PeT が解消され始めている。しかしながら、pH 7.4 付近では顕著な蛍光増大は見られないため、プローブが細胞外液中に存在する通常のイメージングにおいては大きな問題とはならないと判断した。

TLSHalo は十分な細胞膜非透過性を備えていたものの、長時間の染色においては非特異的な取り込みによる輝点の増加が見られる場合がある。そこでさらに TLSHalo のカルボキシ基を反応点として、分子サイズの大きな水溶性担体を結合させることで細胞膜非透過性をより確実なものにできるか検討を行った。具体的にはアミノ基で修飾されたデキストランを担体として用いた。デキストランはグルコースのみが $\alpha$ -1,4 グリコシド結合と $\alpha$ -1,6 グリコシド結合によって多数連なった多糖類の一種である。ここでは水への溶解性、一分子に対する修飾可能なアミノ基の数などを考慮し、1-2 mol / mol のアミノ基を持つ平均分子量 10000 のデキストランを用いた (Figure 2-3-16)。合成スキームを Scheme 3-3-1 に示した。

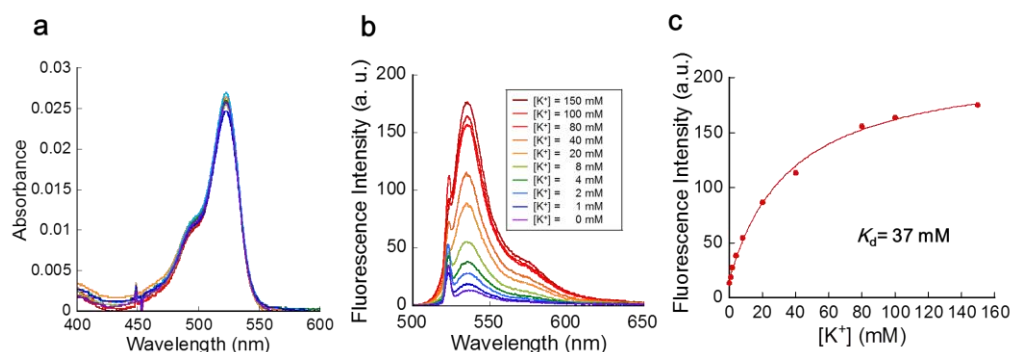


**Figure 2-3-16.** The structure of dextran.



**Scheme 2-3-4.** Synthesis of Dx-TLSHalo. (a) DMT-MM, dextran-amino, 100 mM borate buffer (pH 7.8)

合成した Dx-TLSHalo の光学特性を精査した (Figure 2-3-17, Table 2-3-4)。



**Figure 2-3-17.** (a) Absorption and (b) emission ( $\lambda_{\text{ex}} = 522$  nm) spectra of  $\sim 1$   $\mu\text{M}$  Dx-TLSHalo in 5 mM HEPES buffer (pH 7.0) containing indicated  $[\text{K}^+]$ . Ionic strength was maintained at 150 mM by addition of NaCl. (c) Fluorescence intensity of Dx-TLSHalo as a function of  $\text{K}^+$  concentration.

**Table 2-3-4.** Optical properties of Dx-TLSHalo.

	Abs $\lambda_{\text{max}}$ (nm)	Em $\lambda_{\text{max}}$ (nm)	Quantum Yield
Dx-TLSHalo $[\text{Na}^+] = 150$ mM	522	535	0.007
$[\text{K}^+] = 150$ mM	522	535	0.097
with HaloTag $[\text{Na}^+] = 150$ mM	522	535	0.012
$[\text{K}^+] = 150$ mM	522	535	0.087

$\text{K}^+$ に選択的に応答して蛍光を発するという機能は損なわれなかったものの、デキストランと結合させたことにより、蛍光量子収率が  $\text{K}^+$ との結合の前後で共にほぼ4分の1となった。AvidinにTAC-Limeを直接標識した時のように、デキストランの周辺環境に何らかの影響を受けていると考えている。蛍光分子を消光しうる tyrosine や phenylalanine、tryptophan といったアミノ酸残基が付近に存在しうるタンパク質と違い、多糖類であるデキストランに結合して蛍光量子収率が低下する、ということの原因は現時点では同定できていないものの、TAC-Limeを dextran に直接結合した TAC-Limedex においても同様の傾向が見られることから (※)、TLSHalo に特有な現象ではなく dextran との結合に起因するものであると考えている。一方、HaloTag タンパク質との結合は TLSHalo 単体の時と同様に蛍光量子収率に大きな影響を与えないことが示された。

(※) TAC-Limedex を合成し、 $\Phi$ を測定したところ  $[\text{K}^+] = 150$  mM を含む 5mM HEPES buffer 中で 0.054 であった。



## 第三章

### TLSHalo を用いた 細胞膜近傍における $K^+$ 濃度変化の 検出

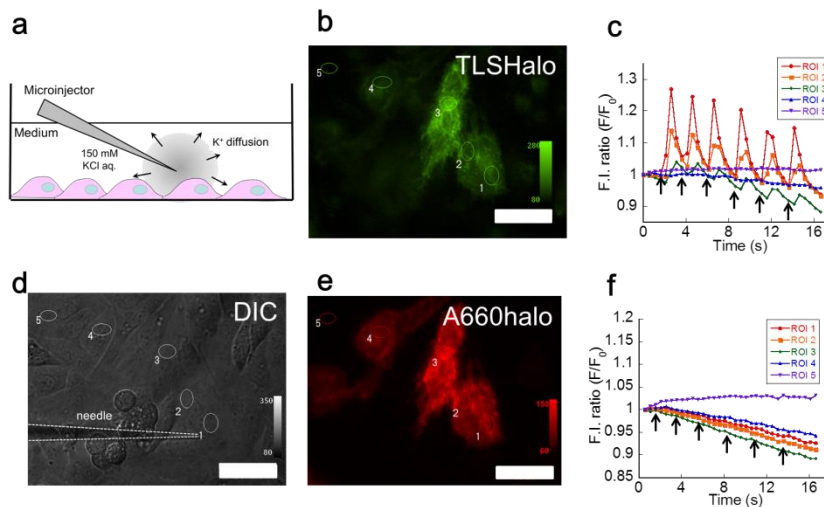
### 第三章 TLSHalo を用いた細胞膜近傍における K<sup>+</sup>濃度変化の検出

#### 第一節 K<sup>+</sup>の局所添加に伴う K<sup>+</sup>拡散の検出

第二章までにおいて、細胞膜上の HaloTag タンパク質と選択的に結合し、K<sup>+</sup>濃度変化を蛍光変化として検出可能なプローブ TLSHalo の開発に成功した。TLSHalo は K<sup>+</sup>濃度の変化に対して可逆的に応答し、また K<sup>+</sup>認識部位である TAC キレーターについて先行論文にてその結合反応速度は  $k_{on} = 0.0020 \pm 0.0003 \text{ mM}^{-1} \text{ ms}^{-1}$ 、解離反応速度は  $k_{off} = 0.12 \pm 0.02 \text{ ms}^{-1}$  と報告されていることから<sup>25</sup>、細胞膜近傍における局所的かつ一時的な K<sup>+</sup>濃度変化をリアルタイムで蛍光検出できることが期待される。

そこで、細胞膜近傍での局所的な K<sup>+</sup>濃度変化を引き起こす方法として、落射顕微鏡下でマイクロインジェクション装置を用いた実験を行った。具体的には、細胞のごく近傍に高濃度の KCl 溶液を充填した針を配置し、そこでごく微量の KCl 溶液を放出する (Figure 3-1-1(a))。これにより、針の近傍では一時的に高濃度の K<sup>+</sup>が存在し、経時的に針から離れた部分へ K<sup>+</sup>が拡散していくという形で、K<sup>+</sup>の絶対量と時間スケールは異なるものの K<sup>+</sup>チャネルの開閉に伴う局所的な [K<sup>+</sup>] 上昇を模した系が作れると考えた。

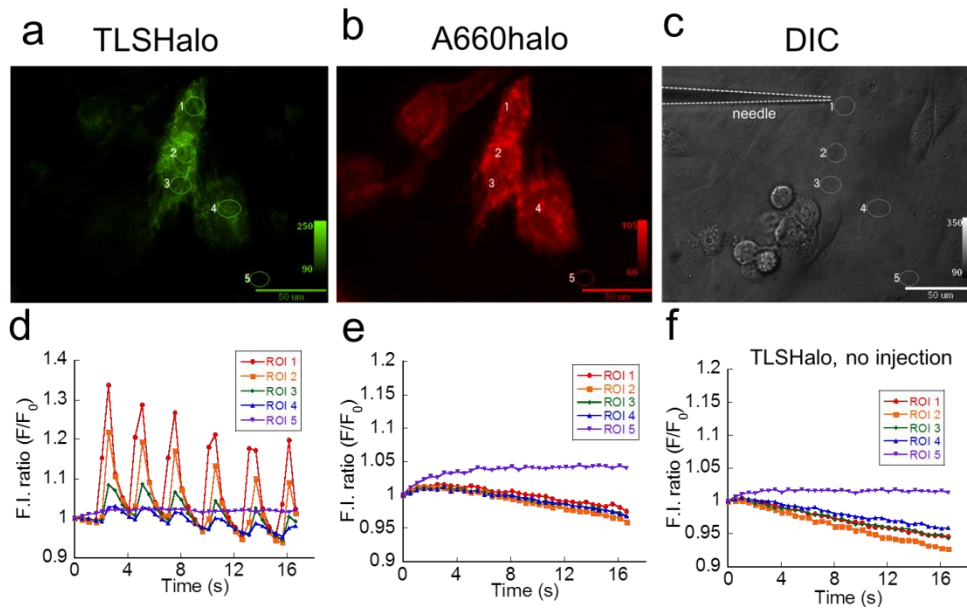
実際にこれを行ったところ、TLSHalo については針の近傍では K<sup>+</sup>添加直後に大きな蛍光上昇が見られ、針先から離れた位置ほど K<sup>+</sup>添加から蛍光上昇までの時間間隔があり、上昇の程度も小さくなった (Figure 3-1-1(b, c, d))。一方、同時に染色した K<sup>+</sup>非応答性の細胞膜非透過性 halo ligand である Alexa660halo では、同様に KCl 溶液を添加しても一時的な蛍光上昇は観察されなかった (Figure 3-1-1(e, f))。なお、TLSHalo、Alexa660halo ともに継時的に蛍光強度が下がってきているが、これは連続観察による色素の褪色によるものと考えている。



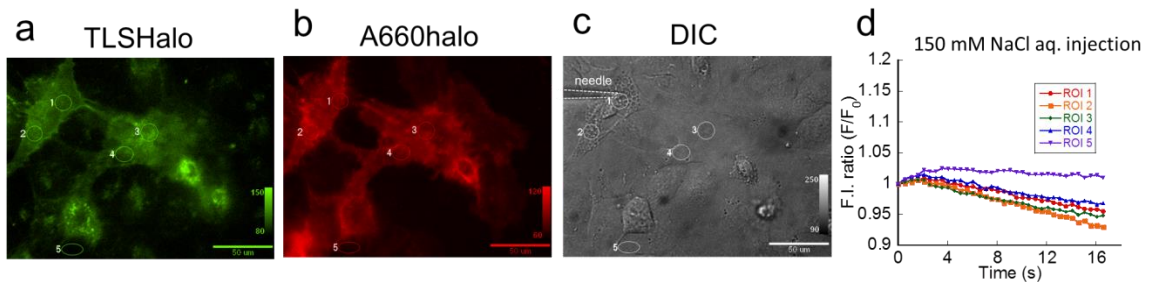
**Figure 3-1-1.** K<sup>+</sup> diffusion imaging using microinjector. (a) Schematic image of the experiment. (b,e) Epifluorescence microscopic images of HeLa cells labeled with 2 μM TLSHalo (b) and 10 nM Alexa660halo (e). (d) DIC images of labeled HeLa cells and microinjection needle. (c,f) Normalized fluorescence intensity ( $F/F_0$ ) of TLSHalo (c) or Alexa660halo (f) in each ROIs as a function of time. During experiment, 150 mM KCl aq. was effused every 2.5 seconds from a micro-injector needle for 300 msec each with 1500 hPa.

同一視野中で針の位置を変えても、同様に TLSHalo でのみ針の近傍の ROI で K<sup>+</sup>添加直後に大きな蛍光上昇が見られ、針先から離れるほど K<sup>+</sup>添加から蛍光上昇までの時間間隔があり、上昇の程度も小さくなった (Figure 3-1-2(b-c))。また、K<sup>+</sup>の添加を行わないただの経時的なイメージングでは TLSHalo の蛍光は上昇しなかった (Figure 3-1-2(f))。また、針の中の溶液を 150 mM の NaCl 溶液に変えて同様の実験を行った場合には、TLSHalo、Alexa660halo とともに蛍光に変化は見られなかった (Figure 3-1-3)。あ

以上より、TLSHalo の蛍光上昇は細胞自身の挙動やインジェクションに伴う機械的刺激などに由来するものではなく、確かに K<sup>+</sup>の添加および拡散を反映したものと言える。

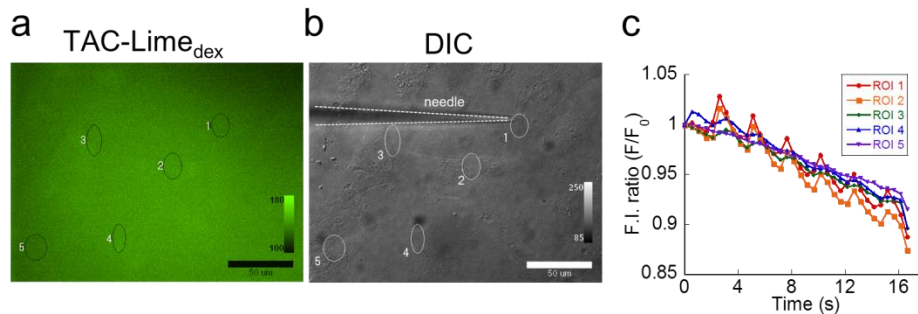


**Figure 3-1-2.**  $K^+$  diffusion imaging using microinjector. (a,b) Epifluorescence microscopic images of HeLa cells labeled with  $2\ \mu\text{M}$  TLSHalo (a) and  $10\ \text{nM}$  Alexa660halo (b). (c) DIC images of labeled HeLa cells and microinjection needle. (d-f) Normalized fluorescence intensity ( $F/F_0$ ) of TLSHalo (d, f) or Alexa660halo (e) in each ROIs as a function of time. In (d) and (e),  $150\ \text{mM}$  KCl aq. was effused every  $2.5$  seconds from a micro-injector needle for  $300\ \text{msec}$  each with  $1500\ \text{hPa}$  during experiment.



**Figure 3-1-3.**  $Na^+$  diffusion imaging using microinjector. (a, b) Epifluorescence microscopic images of HeLa cells labeled with  $2\ \mu\text{M}$  TLSHalo (a) and  $10\ \text{nM}$  Alexa660halo (b). (c) DIC images of labeled HeLa cells and microinjection needle. (d) Normalized fluorescence intensity ( $F/F_0$ ) of TLSHalo in each ROIs as a function of time.  $150\ \text{mM}$  NaCl aq. was effused every  $2.5$  seconds from a microinjector needle for  $300\ \text{msec}$  each with  $1500\ \text{hPa}$  during experiment.

さらに、比較対象として細胞外滞留性の  $K^+$  プロブである TAC-Lime<sub>dex</sub><sup>30</sup> を用いて同様の実験を行った (Figure 3-1-5)。



**Figure 3-1-5.**  $K^+$  diffusion imaging using microinjector. (a) Epifluorescence microscopic images of HeLa cells labeled with 2  $\mu$ M TAC-Lime<sub>dex</sub>. (b) DIC images of labeled HeLa cells and microinjection needle. (c) Normalized fluorescence intensity ( $F/F_0$ ) in each ROIs as a function of time. 150 mM KCl aq. was effused every 2.5 seconds from a microinjector needle for 300 msec each with 1500 hPa during experiment.

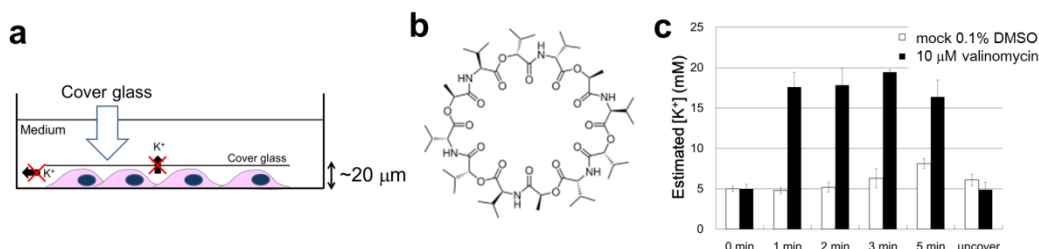
TAC-Lime<sub>dex</sub> の場合は、TLSHalo と同様に針先の近傍では比較的早く大きな蛍光上昇があり、離れるにつれて蛍光の立ち上がりは遅く、小さくなっていくという傾向はあるものの、バックグラウンド蛍光が大きいためそのシグナル自体は増分が非常に小さく、また細胞の形は当然ながら落射顕微鏡では全く判別できないため、目的の細胞表面のどの部分でどの程度 $[K^+]$ の変化が起きているかは判断できない。また、TAC-Lime<sub>dex</sub> は多糖類である dextran と結合しており  $K^+$  と比べれば分子量が大きく拡散速度には差があるものの、プロブ自体も拡散しうるため、灌流の必要な系などでは使い勝手も良くないと考えられる。

この、「標的とする細胞の表面のうち特に注目する部分での局所的な $[K^+]$ 変化を（理想的には）見積もることができる」というのは、既存の細胞外全体に滞留するタイプの  $K^+$  プロブと比べて優れた点である。

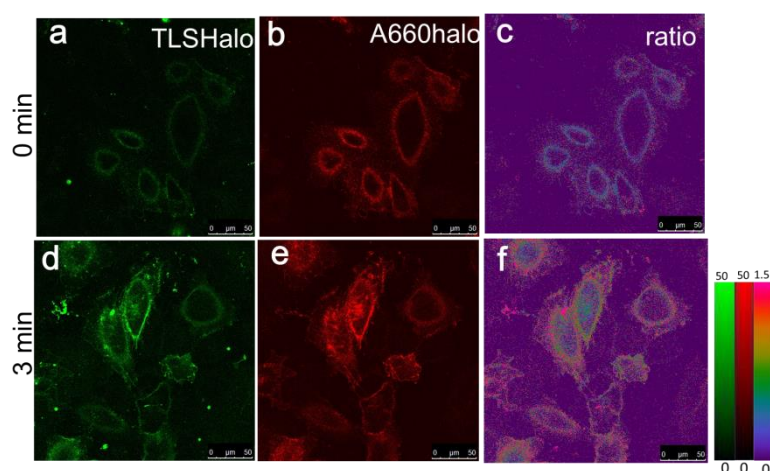
## 第二節 $K^+$ ionophore を用いた $K^+$ 流出の検出

TLSHalo が細胞外に添加した  $K^+$  濃度を反映した蛍光強度変化を見せることが確かめられたため、続いて細胞からの  $K^+$  流出に伴う細胞外液の  $K^+$  濃度変化を検出することを試みた。まず  $K^+$  の ionophore を用いて外液への  $K^+$  流出を惹起した。

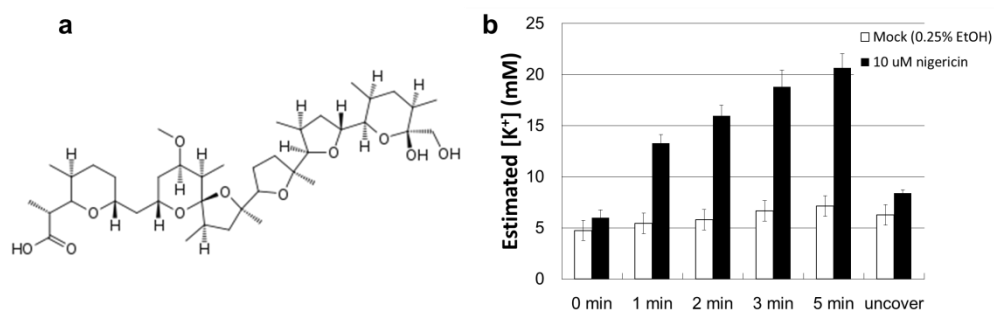
脳切片や血管壁など、生体内において  $K^+$  濃度変化が重要な意味を持つ部位においては細胞外液の体積は限られており、細胞は自身や周辺の細胞から流出する  $K^+$  による  $K^+$  濃度変動に晒されている。そのような環境を模して、ionophore の添加直後に観察部にカバーガラスを載せることで  $K^+$  の拡散可能な細胞外液の体積を局限した状態でイメージングを行った (Figure 3-2-1~3-2-4)。TLSHalo と Alexa660halo で競合的に染色を行い、 $K^+$  非依存的な Alexa660halo の蛍光をリファレンスとすることで TLSHalo の蛍光強度変化から細胞膜近傍の  $K^+$  濃度を算出した。蛍光強度からの  $K^+$  濃度の算出には、Figure 2-3-12 の検量線を用いた。



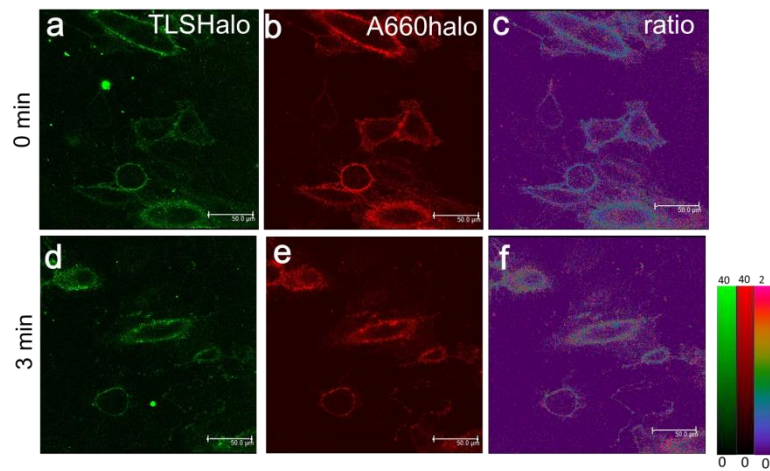
**Figure 3-2-1.** Detection of  $K^+$  efflux induced by  $K^+$  ionophore, 10  $\mu M$  valinomycin under cover glass. (a) Schematic representation of the experiment. (b) Structure of valinomycin. (c)  $K^+$  concentration was estimated from 3 ROIs of confocal microscopic images of HeLa cells labeled with TLSHalo and Alexa660halo. Error bar: S.D.



**Figure 3-2-2.** Confocal microscopic images of HeLa cells labeled with TLSHalo and Alexa660halo. Cover glass was mounted just after an addition of  $K^+$  ionophore, 10  $\mu M$  valinomycin, to induce  $K^+$  efflux. Fluorescence of TLSHalo (a, d), Alexa660halo (b, e) before or 3 minutes after addition of valinomycin. (c, f) Fluorescence intensity ratio images before or 3 minutes after addition of valinomycin.



**Figure 3-2-3.** Detection of  $K^+$  efflux induced by  $K^+$  ionophore, 10  $\mu M$  nigericin under cover glass. (a) Structure of nigericin. (b)  $K^+$  concentration was estimated from 3 ROIs of confocal microscopic images of HeLa cells labeled with TLSHalo and Alexa660halo. Error bar: S.D.



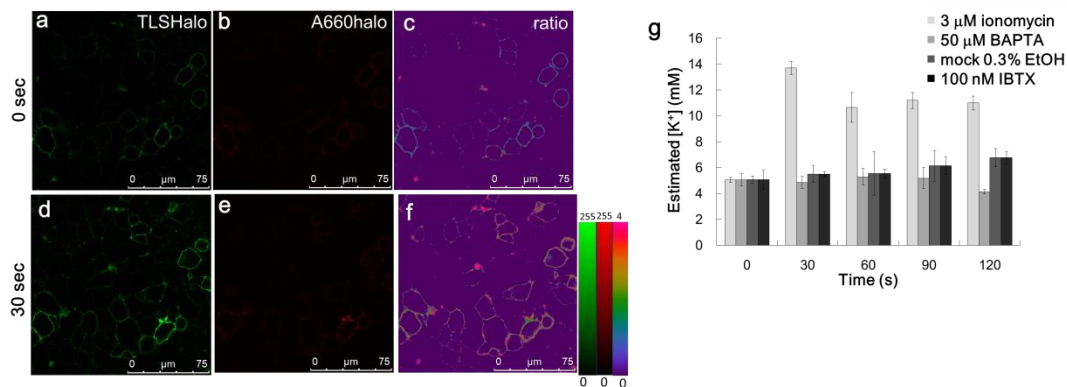
**Figure 3-2-4.** Confocal microscopic images of HeLa cells labeled with TLSHalo and Alexa660halo. Cover glass was mounted just after an addition of  $K^+$  ionophore, 10  $\mu M$  nigericin, to induce  $K^+$  efflux. Fluorescence of TLSHalo (a, d), Alexa660halo (b, e) before or 3 minutes after addition of nigericin. (c, f) Fluorescence intensity ratio images before or 3 minutes after addition of nigericin.

各種 ionophore 添加によって細胞膜上の緑色蛍光の経時的な増大が観察された。なお valinomycin は細胞内で  $K^+$  と結合し、これを細胞外へと運び出すキャリア型の ionophore であり、nigericin は細胞膜を隔てて  $K^+$  を細胞外へ、 $H^+$  を細胞内へと輸送する antiporter としての働きを持つ ionophore である。カバーガラスをかけただけではこのような蛍光上昇は生じず、またカバーガラスを外すことで蛍光強度はもとの水準まで戻った。以上より、TLSHalo はカバーガラス下の局限された細胞外液中で ionophore によって引き起こされる  $K^+$  濃度の上昇を、細胞膜上で検出していると考えられる。



### 第三節 $\text{Ca}^{2+}$ 依存性 $\text{K}^+$ チャネルを介した $\text{K}^+$ 流出の検出

さらに、より生理的な条件下での  $\text{K}^+$ 流出についても検討すべく、細胞に内在する  $\text{K}^+$ チャネルを刺激することによる  $\text{K}^+$ 流出の検出を試みた。具体的には、 $\text{Ca}^{2+}$ 依存性  $\text{K}^+$ チャネルである BK チャネルを発現する HT29 細胞を用いて BK チャネルの開口に伴う  $\text{K}^+$ 流出を惹起した<sup>53</sup>(Figure 3-3-1)。

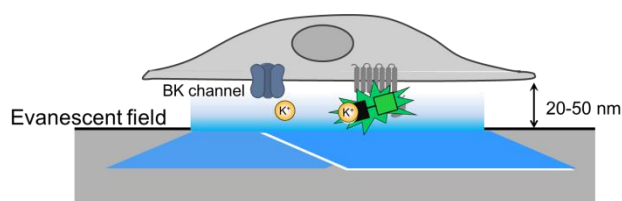


**Figure 3-3-1** Detection of  $\text{K}^+$  efflux through BK channel induced by 3  $\mu\text{M}$  ionomycin under cover glass. (a-f) Confocal microscopic images of HT29 cells labeled with TLSHalo and Alexa660halo. Cover glass was mounted just after an addition of  $\text{Ca}^{2+}$  ionophore, 10  $\mu\text{M}$  ionomycin, to induce  $\text{Ca}^{2+}$  influx. Fluorescence of TLSHalo (a, d), Alexa660halo (b, e) before or 3 minutes after addition of ionomycin. (c, f) Fluorescence intensity ratio images before or 3 minutes after addition of ionomycin. (g)  $\text{K}^+$  concentration was estimated from 3 ROIs of confocal microscopic images of HT29 cells labeled with TLSHalo and Alexa660halo. Error bar: S.D.

Ionomycin による  $\text{Ca}^{2+}$ 刺激の直後に、ionophore の時と同様にカバーガラスを載せてイメージングを行ったところ、細胞膜上の緑色蛍光の増大が観察された。この蛍光増大は細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ のキレーターである BAPTA や BK チャネル阻害剤である iberiotoxin の添加によって抑えられたことから、イメージング結果が BK チャネルを介して流出した  $\text{K}^+$ による  $\text{K}^+$ 濃度上昇を反映していることが強く示唆された。

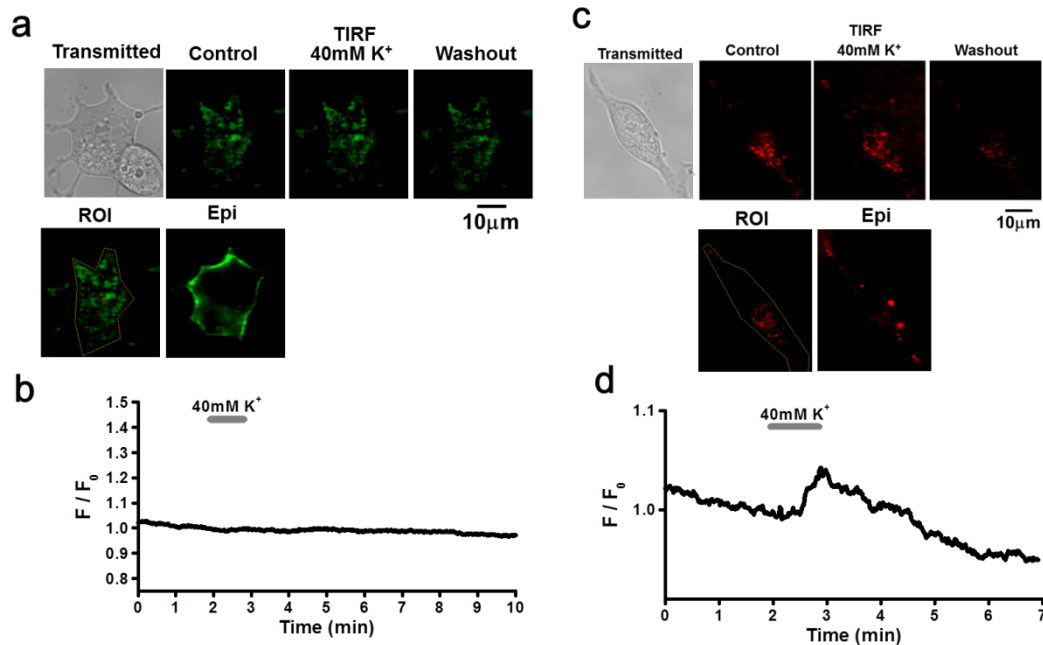
#### 第四節 全反射照明蛍光顕微鏡を用いた細胞底面における $K^+$ 流出の検出

第三節ではカバーガラス下で細胞から流出する  $K^+$  の蛍光検出を行った。これは周囲の細胞全体から流出する  $K^+$  による平均的な濃度変化を検出していると考えられるが、実験の手法上、刺激の前後での継時的な蛍光観察は困難であり、刺激直後に細胞表面において局所的な  $K^+$  濃度変化が生じるのか、またこれを捉えられるかについては判断できていない。そこで、継時的な観察が可能な細胞間隙の別のモデル系として、全反射照明蛍光顕微鏡 (TIRF) を用いた細胞の接着底面とディッシュの間の領域における  $K^+$  流出の蛍光検出を試みた。具体的には、BK チャネルおよび sp-HT-Rhod を遺伝子導入した HEK 細胞に TLSHalo を標識し、パッチクランプによって脱分極刺激を与えて BK チャネルを電位依存的に開口させる。これに伴う  $K^+$  の流出に対して、細胞底面における TLSHalo がどのような蛍光変化を見せるかについて、全反射蛍光顕微鏡を用いて観察した (Figure 3-4-1)。以降の  $K^+$  の灌流およびパッチクランプ法 (Whole cell clamp) の実験については、名古屋市立大学大学院薬学研究科、細胞分子薬効解析学分野 (今泉祐治教授) 所属の山村寿男准教授のご協力を得て、実験を行って頂いた。



**Figure 3-4-1** Schematic image of  $K^+$  imaging at the bottom of cell using TIRF microscopy.

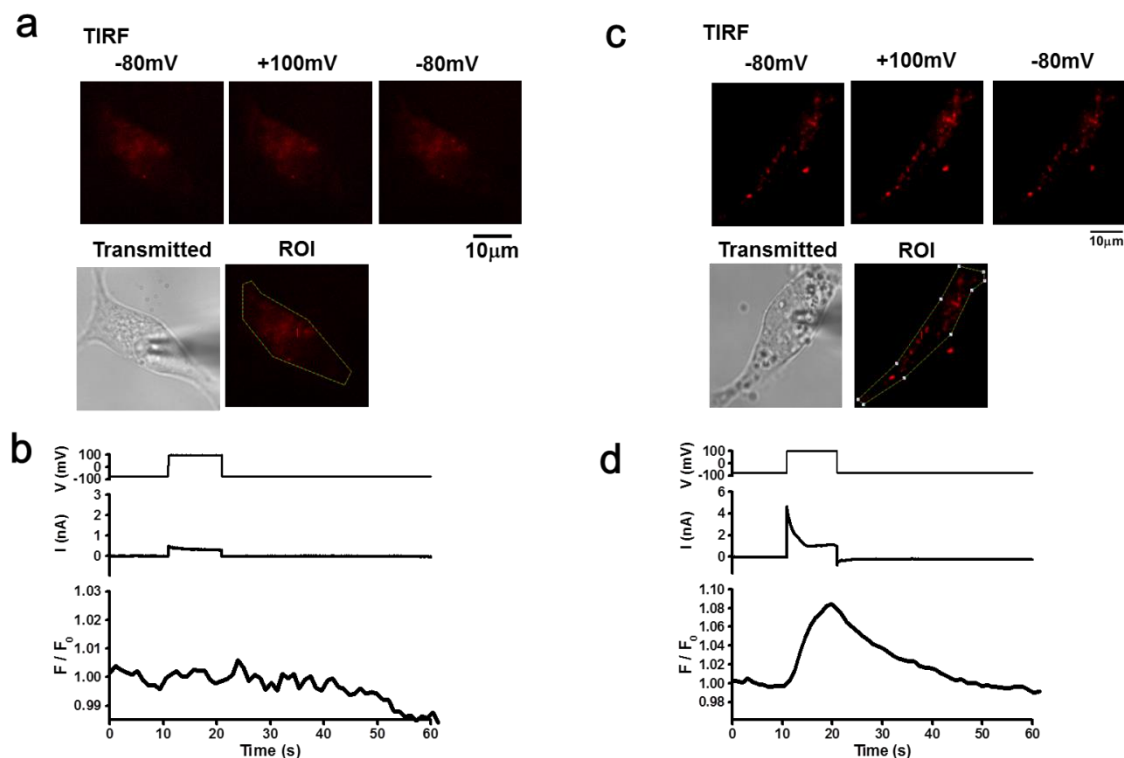
まず、細胞底面における  $K^+$  濃度変化に対して TLShalo が蛍光応答を見せるかについて、細胞外液に高濃度の  $K^+$  溶液を還流することで確認した (Figure 3-4-2)。



**Figure 3-4-2.** Fluorescence changes of TLShalo or Alexa488halo during the perfusion of  $K^+$  solution at the bottom of labeled HEK cell. (a) TIRF microscopic images of the cell labeled with Alexa488halo in each timepoint. (b) Fluorescence intensity transition of TLShalo during perfusion. (c) TIRF microscopic images of the cell labeled with TLShalo in each timepoint. (d) Fluorescence intensity transition of TLShalo during perfusion.

このように、カリウム非応答性の Alexa488halo で染色した場合は蛍光変化が見られない一方、TLShalo で染色した場合には  $K^+$  溶液の灌流に伴い、やや遅れたタイムスケールで蛍光の一過性の上昇が観察された。この遅れは細胞底面の狭い領域へ灌流液が徐々に入り込み、出ていく様子を反映していると考えられる。

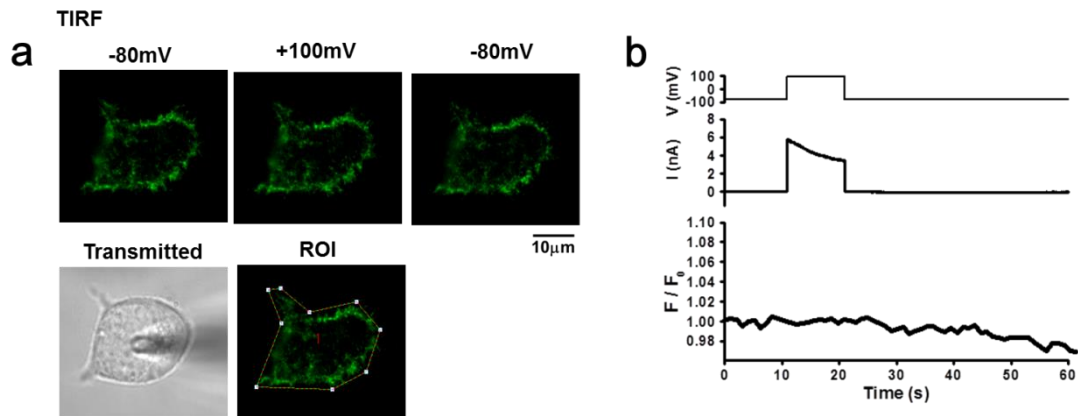
続いて、パッチクランプにより 100 mV の電圧を一時的に印加した際の TLShalo の蛍光強度変化を観察した (Figure 3-4-3)。



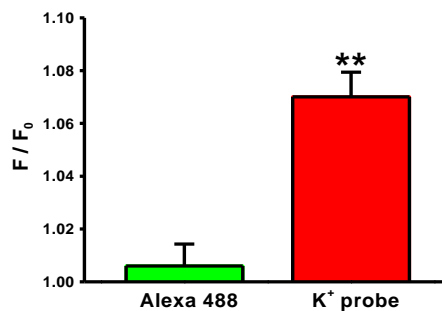
**Figure 3-4-3.** Fluorescence changes of TLShalo during depolarization by whole-cell patchclamp at the bottom of labeled cell. (a) TIRF microscopic images of HEK in each timepoint. The cell was labeled with TLShalo but BK channel current was not observed. (b) Fluorescence changes of TLShalo during depolarization at the bottom of HEK shown in (a). (c) TIRF microscopic images of HEK in each timepoint. The cell was labeled with TLShalo and BK channel current was observed. (d) Fluorescence changes of TLShalo during depolarization at the bottom of HEK shown in (c).

TLShalo の蛍光は観察されるものの 100 mV の脱分極刺激時に BK チャネル由来の電流が見えない、すなわち BK チャネルの発現していない細胞においては蛍光変化が見られない (Figure 3-4-3(b)) 一方、BK チャネル電流が見られる細胞においては TLShalo の蛍光の一過性の上昇が観察された (Figure 3-4-3(d))。電圧の印加と電流の上昇に比べて蛍光の立ち上がりはやや遅く徐々に上昇し、電圧の印加を止めると蛍光強度は徐々にもとの水準に戻った。このような挙動は K<sup>+</sup>溶液を灌流させた際のものと類似している。

また、 $K^+$ 非応答性の Alexa488halo で標識した HEK 細胞についても同様の実験を行った結果、電圧の印加に伴う BK チャネル電流は観察されたが蛍光の上昇は見られなかった (Figure 3-4-5)。Alexa488halo と TLShalo それぞれについて 4 回の実験の最大蛍光応答の平均と分散を求めると、TLShalo の蛍光上昇は Alexa488halo のものに比べて有意に大きかった (Figure 3-4-6)。



**Figure 3-4-5.** Fluorescence changes of Alexa488halo during depolarization by whole-cell patchclamp at the bottom of labeled cell. (a) TIRF microscopic images of HEK in each timepoint. The cell was labeled with Alexa488halo and BK channel current was observed. (d) Fluorescence changes of Alexa488halo during depolarization at the bottom of HEK shown in (c).

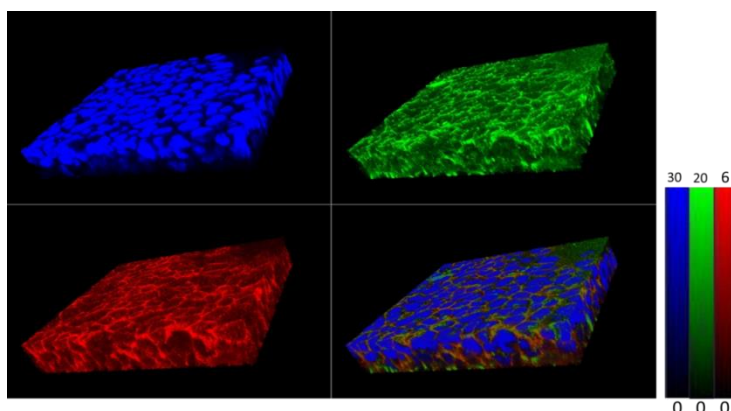


**Figure 3-4-6.** Average fluorescence intensity changes of Alexa488halo and TLShalo during depolarization by whole-cell patchclamp at the bottom of labeled cell. Alexa488halo:  $F/F_0 = 1.006 \pm 0.008$  (n=4), TLShalo:  $F/F_0 = 1.070 \pm 0.009$  (n=4). The statistical significance is expressed as  $p=0.002$  vs. control (Alexa488halo).

以上の実験より、TLShalo の蛍光強度変化が細胞底面における  $K^+$  の流出と、電圧印加を止めた後の細胞底面間隙から細胞外液への  $K^+$  の拡散を反映していることが示唆された。

## 第五節 Cell sheet 中の細胞間隙における K<sup>+</sup>濃度変化の検出

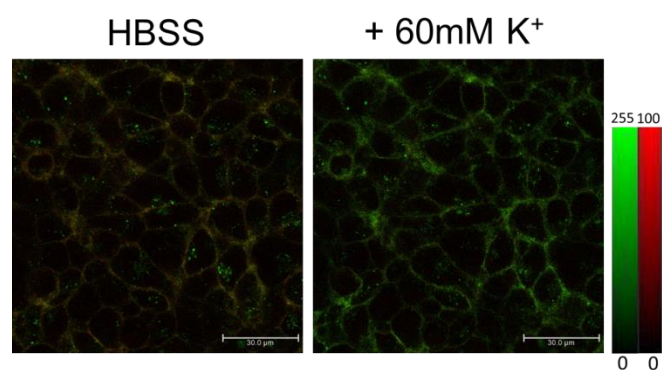
第四節までで、K<sup>+</sup>の拡散可能な細胞外液の体積を限局した状態での K<sup>+</sup>濃度変化の検出について述べた。これは例えば生体内において細胞膜近傍の K<sup>+</sup>濃度変化が特に重要な役割を持つと考えられる脳などの神経系や血管壁の内皮細胞・平滑筋細胞の間隙など、細胞同士が近接し、細胞外液の液量が少ない領域のモデル系として考えることができ、より高次の生体サンプルへの応用の可能性を示すものといえる。しかしながら、今回開発した測定系では HaloTag タンパク質を遺伝子導入する必要がある、そのような生体サンプルを用いた測定を行うのは容易ではない。そこで、よりそれらの生体サンプルに近い評価系として、3次元培養した細胞を用いた評価を検討した。具体的には、日本バイリン社から販売されている高純度シリカ 3 次元培養担体である Cellbed®を用いてシート状の細胞培養を行った<sup>54</sup>。細胞にはかずさ DNA 研究所の長瀬隆弘博士より分譲して頂いた、N 端に HaloTag タンパク質のついたアンジオテンシン II 受容体タイプ 1 が定常発現している HEK 細胞 (HT-HEK) を用いた。Figure 3-5-1 に、TLSHalo および K<sup>+</sup>非応答性の蛍光リガンドである Alexa660halo を用いて cell sheet を染色した際の蛍光像を示す。



**Figure 3-5-1.** Z stack of confocal microscopic images of HEK-HT cell sheet. The cells were stained by 10  $\mu$ M Hoechst 33342, 2  $\mu$ M TLSHalo and 10 nM Alexa660halo in DMEM at rt, 30min. 30  $\mu$ m height, images were captured in each 1  $\mu$ m.

蛍光像では、表層から 2-3 層程度の細胞シートが厚さ 30  $\mu$ m 程度で重なっている様子が観察された。Hoechst33342 の蛍光が観察可能な範囲とほぼ同等の深さの範囲で TLSHalo および Alexa660halo 由来の蛍光も観察された。また、TLSHalo はシリカファイバーも染色してしまうという性質を有していた。

同 cell sheet に対して、細胞外液に KCl 溶液を加えて蛍光強度の変化を観察した (Figure 3-5-2)。



**Figure 3-5-2.** Confocal microscopic images of HEK-HT cell sheet labeled with 2  $\mu\text{M}$  TLShalo and 10  $\mu\text{M}$  Alexa660halo. The images were taken in HBSS containing indicated concentration of  $\text{K}^+$ . Green:  $\lambda_{\text{ex}} = 522 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 535\text{-}570 \text{ nm}$ , gain = 800. Red:  $\lambda_{\text{ex}} = 660 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 680\text{-}800 \text{ nm}$ , gain = 800

Figure 3-5-2 は細胞シートの表面から 10  $\mu\text{m}$  程度の深さの部分の蛍光像であるが、添加した  $\text{K}^+$  が迅速に到達し、TLShalo 由来の蛍光強度が上昇していた。

TLShalo の応答性が確認できたため、同 cell sheet に対して  $\text{K}^+$  ionophore である valinomycin を添加して蛍光強度変化の観察を試みたものの、残念ながら添加後 5 分間で顕著な TLShalo の蛍光変化は認められなかった。外液に添加した  $\text{K}^+$  に対して添加直後に応答していたこと、カバーガラス下の実験では valinomycin 添加によって迅速な蛍光上昇が見られたことなどから考えると、valinomycin が観察部に到達していないというよりは、細胞の集まり方が比較的緩いために流出した  $\text{K}^+$  の細胞外液への拡散が早く、検出可能な濃度変化が起こっていない可能性が考えられる。 $\text{K}^+$  プローブを用いたイメージングを行うには、より密接に細胞同士が接着した実験系を用いる必要があると考えられる。

## 第四章

K<sup>+</sup>チャネルの直接標識による、  
K<sup>+</sup>チャネル活動の蛍光検出



## 第四章 K<sup>+</sup>チャネルの直接標識による、K<sup>+</sup>チャネル活動の蛍光検出

### 第一節 細胞膜上での K<sup>+</sup>プローブと K<sup>+</sup>チャネルの位置関係に関する考察

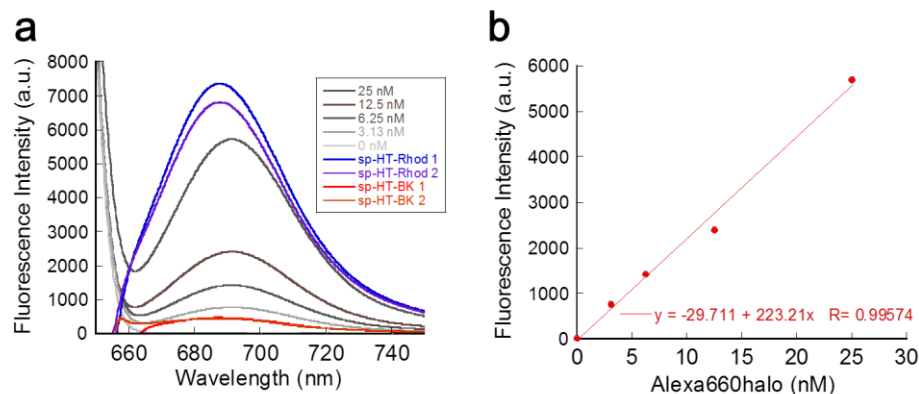
これまでの検討では、K<sup>+</sup>プローブを細胞膜に局在させる担体として N 末端に HaloTag タンパク質を結合させた rhodopsin を用いて、細胞表面における K<sup>+</sup>濃度変動の検出に成功した。同手法は細胞外滞留性の K<sup>+</sup>プローブと比べて、注目する細胞が表面のどの部分で、どの程度の K<sup>+</sup>濃度変動に晒されているかを蛍光イメージングするのに有用な性質を備えていることを示した。しかしながら、この測定法でさらに詳細な解析、例えば通常のイメージング条件下で K<sup>+</sup>濃度変化を指標とした K<sup>+</sup>チャネル活性化のリアルタイム検出などの達成を期待するのは難しいと考えられる。以下でこの点について考察する。

まず各種の K<sup>+</sup>チャネルの細胞膜上における密度について、例えば Florian らはパッチクランプを用いた電流測定により、前立腺がん由来の LNCaP 細胞における細胞膜上の BK チャネルの発現量は 1 個/ $\mu\text{m}^2$  程度と報告している<sup>55</sup>。また Volodymyr らは IK1 チャネルを 1 次抗体及び量子ドット (Quantum Dot; QD) で標識した 2 次抗体で標識し、輝点の数を数えることで MDCK-F-5B8 細胞の表面における IK1 チャネルの個数を 2 個/ $\mu\text{m}^2$  と見積もっている<sup>56</sup>。これに加えて、細胞のふちの部分で発現が多い、一部で複数の K<sup>+</sup>チャネルがクラスターを形成するなどの空間的な局在の偏りがあるために、細胞膜上での K<sup>+</sup>チャネルの密度はごく小さいものになる。

一方、sp-HT-Rhod を用いた場合の細胞膜上の K<sup>+</sup>プローブの密度について考える。

sp-HT-Rhod を一過性に遺伝子導入した HeLa 細胞を Alexa660halo で染色後、遺伝子導入率と細胞の表面積を概算し、細胞破碎液の蛍光を測定することで細胞表面の単位面積当たりの発現量を概算した。10 cm culture dish 1 枚分のライセートを用いて測定を行った。未

標識の Alexa660halo で作成した検量線から計算した結果、遺伝子導入から 24 時間後の時点での sp-HT-Rhod の発現量は 4000-5000 個/ $\mu\text{m}^2$  程度と見積もられた。

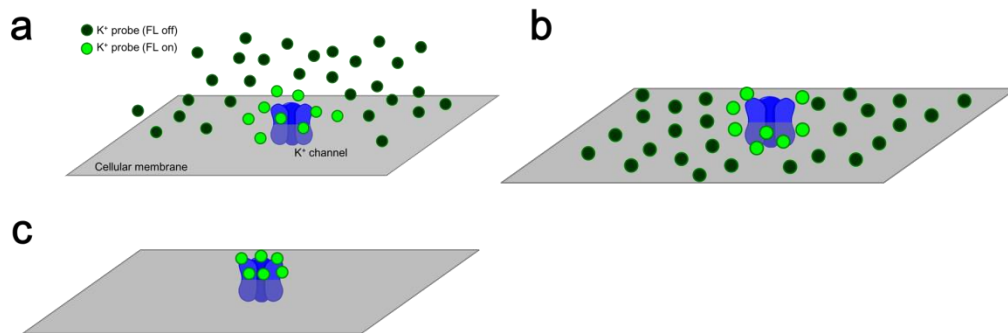


**Figure 4-1-1.** Estimation of HaloTag-fused membrane protein expression amount in HeLa cells. (a) Fluorescence emission spectra of Alexa660halo in PBS : lysis buffer = 2 : 1 or cell lysate ( $\lambda_{\text{ex}} = 640 \text{ nm}$ ). HeLa cells expressing HaloTag-fused membrane protein were labeled by Alexa660halo before lysed and sonicated. (b) Fluorescence intensity of Alexa660halo as a function of concentration.

すなわち、1  $\mu\text{m}^2$  の細胞表面において、1-5 個程度の  $\text{K}^+$ チャネルに対し 1000 倍量程度の  $\text{K}^+$ プローブが存在することになる。また、 $\text{K}^+$ チャネルから放出された  $\text{K}^+$ は 3 次元的に迅速に拡散し、その濃度は開口部から指数関数的に減少していく。これらを考慮すると、チャネルの周囲数十 nm より外の  $\text{K}^+$ プローブは  $\text{K}^+$ の濃度変動に晒されず、その蛍光はノイズとなってチャネル周辺のプローブの蛍光変化の検出感度を下げる原因となると考えられる (Figure 4-1-2(b))。細胞表面への局在を示さない細胞外滞留型の  $\text{K}^+$ プローブ (Figure 4-1-2(a)) と比べればノイズを大きく抑えられているといえるものの、高感度な  $\text{K}^+$ チャネル活性検出に向けてはまだ改良の余地がある。

一方で、HaloTag タンパク質を利用する今回の手法は細胞膜局在のための部位として様々なタンパク質が選べ、より高度に局在を制御可能なことが利点の一つである。そこで、HaloTag タンパク質を直接  $\text{K}^+$ チャネルに結合させ、 $\text{K}^+$ プローブを  $\text{K}^+$ チャネルの開口部周

辺のみに集積させることができれば、 $K^+$ 流出を感受しない  $K^+$ プローブに由来するバックグラウンド蛍光を除くことでより高い検出感度が得られ、 $K^+$ チャネル活性化の蛍光検出が可能になるのではないかと考え、次節で検討を行った (Figure 4-1-2(c))。なお、このような研究の例として、 $Ca^{2+}$ においては実際に  $Ca^{2+}$ チャネル近傍の microdomain における  $Ca^{2+}$ 濃度変化が注目されており、aequorin や GCaMP などの高速・高感度な  $Ca^{2+}$ 蛍光プローブを用いたチャネル近傍における特徴的な  $Ca^{2+}$ 濃度変化や生命現象との関連に関する研究が多くなされている<sup>57,58,59</sup>。



**Figure 4-1-2.** Schematic images of signal-noise level difference in each  $K^+$  detection method with  $K^+$  probe. (a) Non-tethering, membrane impermeable  $K^+$  probe. (b) Membrane localizable  $K^+$  probe. (c)  $K^+$  probe directly labeled to  $K^+$  channel.

## 第二節 BK チャネル N 末端への HaloTag タンパク質の導入

K<sup>+</sup>チャネル活性化の直接的な蛍光検出の実現を期待して、HaloTag タンパク質を直接 K<sup>+</sup>チャネルに結合させた融合タンパク質のコンストラクト作成および細胞系への発現を試みた。

具体的には、Ca<sup>2+</sup>依存性 K<sup>+</sup>チャネルである BK チャネルの N 末端に HaloTag タンパク質を結合させることとした。多くの K<sup>+</sup>チャネルは 6 回膜貫通型であって、N 末端・C 末端ともに細胞膜内側に向いているが、BK チャネルは例外的に S0 ドメインという部分を持っており (Figure 4-2-1)、N 末端が細胞膜外側に出ていること、N 末端に蛍光タンパク質やペプチドタグを組み込んでも機能を保ったまま細胞膜上に発現すること、また開口刺激として Ca<sup>2+</sup>流入刺激を加えればよく、顕微鏡下の評価もしやすいことなどから、標的として適していると考えた。なお、BK チャネルは血管平滑筋細胞などに存在し、チャネル部分は BK channel  $\alpha$  subunit の 4 量体で形成され、種々の  $\beta$  subunit と複合体を作ることによって様々な開口時間を示し、選択的な開口薬として NS-1619 やピマル酸、阻害薬として iberiotoxin や charybdotoxin、paxillin などが知られている<sup>60</sup>。IL-6 由来の膜移行シグナルおよび HaloTag タンパク質をコードしたプラスミドに対し、この BK channel  $\alpha$  subunit を導入した (Figure 4-2-2)。

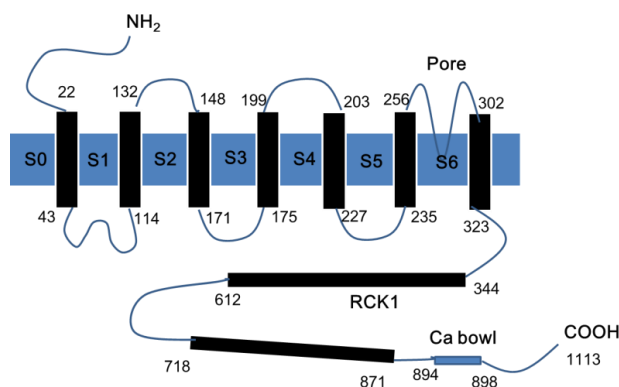
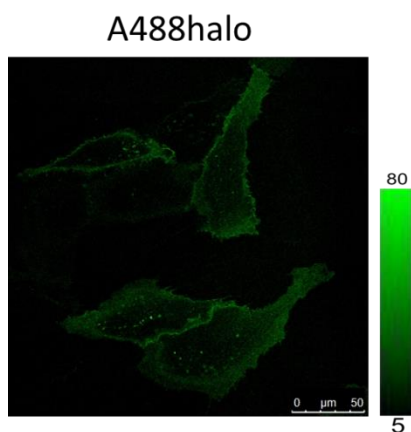


Figure 4-2-1. Topology of human BK channel.



**Figure 4-2-2.** Construct of the plasmid coding HaloTag-human BK channel fusion protein (sp-HT-BK $\alpha$ ).

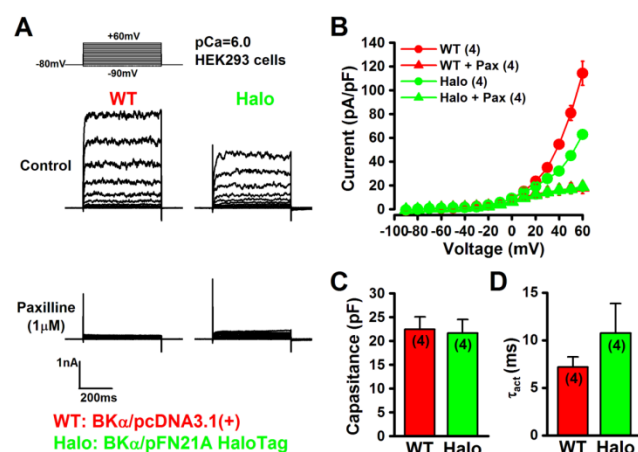
作成したプラスミド(sp-HT-BK $\alpha$ )をHeLa細胞に遺伝子導入し、細胞膜非透過性 HaloTag ligand である Alexa448halo を用いて染色して細胞膜上に sp-HT-BK $\alpha$ が発現しているかを調べた (Figure 4-2-3)。



**Figure 4-2-3.** Confocal microscopic images of HeLa cells transfected with sp-HT-BK $\alpha$ . The cells were incubated with 1  $\mu$ M Alexa488halo at 37 °C for 20 min. Imaging was performed in HBSS. Green:  $\lambda_{\text{ex}}$  = 488 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 500-600 nm, HyD, gain = 100. BF: gain = 560. Scale bar: 50  $\mu$ m

一部の細胞の細胞膜上が Alexa488halo で染色されたことから、sp-HT-BK $\alpha$ は期待通り細胞膜上に発現していることが確認できた。しかしながらこれまで用いていた sp-HT-Rhod と比べると発現量はかなり少なく留まっていた。

続いて、HaloTag タンパク質を N 末端に結合させた状態でも BK $\alpha$ が電気生理的な特性を保持しているか否かを、第三章第四節の実験と同様、名古屋市立大学の山村寿男准教授のご協力を得て、パッチクランプ法 (Whole cell clamp) を用いて確認して頂いた (Figure 4-2-4)。



**Figure 4-2-4.** Electrophysiological properties of HT-BK $\alpha$ . (A) The membrane currents of cells transfected with BK $\alpha$  or HT-BK $\alpha$  during a series of voltage steps to +60 or -90 mV from a holding potential of -80 mV with or without paxilline. (B) The membrane currents as a function of applied voltage. (C) Capacitance of each transfected cell. (D) Activated time constant of each transfected cell.

A : 電流原図。上段は印加している電圧、中段はそれに応じて流れた電流の大きさを示す。

横軸は時間。下段は BK channel の選択的阻害剤である paxilline を投与した際の電流変化。投与によって電流が抑えられている。

B : 電流電圧関係。sp-HT-BK $\alpha$ の電流（発現）量が BK-WT の半分程度になっているが、主に発現ベクターの違いによるチャンネルの発現量の差を反映している可能性が高い。

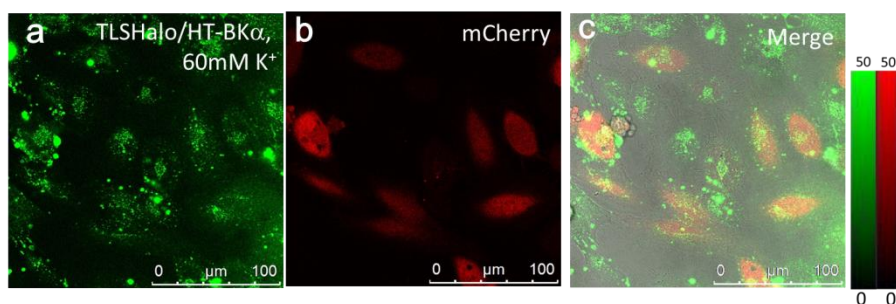
C : 細胞容量。1 V の電位差のあるときに 1 C (Coulomb) の電荷を蓄えることのできる容量のことを 1 F (Farad) という。

D : 活性化時定数。時定数は定常状態の  $1-e^{-1}$  (約 63%) に達する、または初期値の  $e^{-1}$  (約 37%) にまで減衰するまでの時間と定義され、膜抵抗と膜容量の積として求められる。

以上の結果より、作成した sp-HT-BK $\alpha$ は BK チャンネルとしての機能を保持していることが確認できた。A、B で WT に比べて sp-HT-BK $\alpha$ の電流が小さいが、これは発現 vector の違いによる発現量の差に由来するものと考えられる。

### 第三節 TLSHalo による蛍光標識

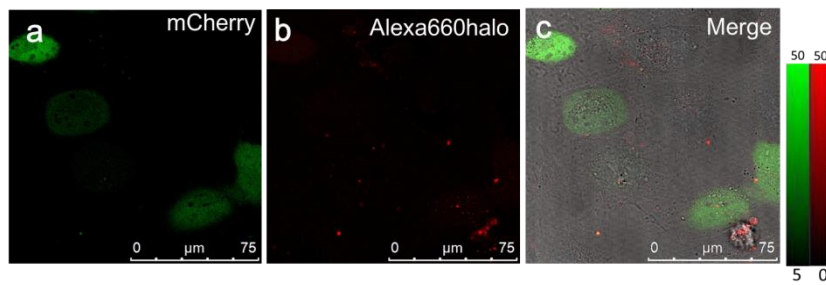
HT-BK $\alpha$ が細胞膜上でチャネルとして機能することが担保出来たので、これを TLSHalo で染色し、刺激に伴う K<sup>+</sup>流出が観察できるかについて検討を行った。まず共焦点顕微鏡下で TLSHalo による細胞膜染色が可能かについて検討した (Figure 4-3-1)。



**Figure 4-3-1.** Confocal microscopic images of HeLa cells transfected with sp-HT-BK $\alpha$  and mCherry. The cells were incubated with 2  $\mu$ M TLSHalo in DMEM at 25 °C for 30 min. Imaging was performed in HBSS containing 60 mM K<sup>+</sup>. (a) TLSHalo, (b) mCherry, (c) Merge. Green (TLSHalo):  $\lambda_{\text{ex}}$  = 514 nm Ar laser 30%,  $\lambda_{\text{em}}$  = 525-560 nm, HyD, gain = 100.. Red (mCherry):  $\lambda_{\text{ex}}$  = 543 nm (Ar laser 30%),  $\lambda_{\text{em}}$  = 580-700 nm, PMT, gain = 800  
Scale bar: 100  $\mu$ m

期待に反して、遺伝子導入の有無に関わらず細胞内で見られる緑色輝点（非特異的な取り込みおよび自家蛍光由来と考えられる）が見られるばかりで、TLSHalo を付加した HeLa 細胞における細胞膜上での緑色蛍光は観測されなかった。K<sup>+</sup>を細胞外液に添加したうえでレーザー強度および検出感度を高く設定したものの、細胞膜上における明確な蛍光は観測されなかった。

何らかの理由で TLSHalo がそもそも標識されていない可能性を考え、観察直後に Alexa660halo を加えて追染色した (Figure 4-3-2)。

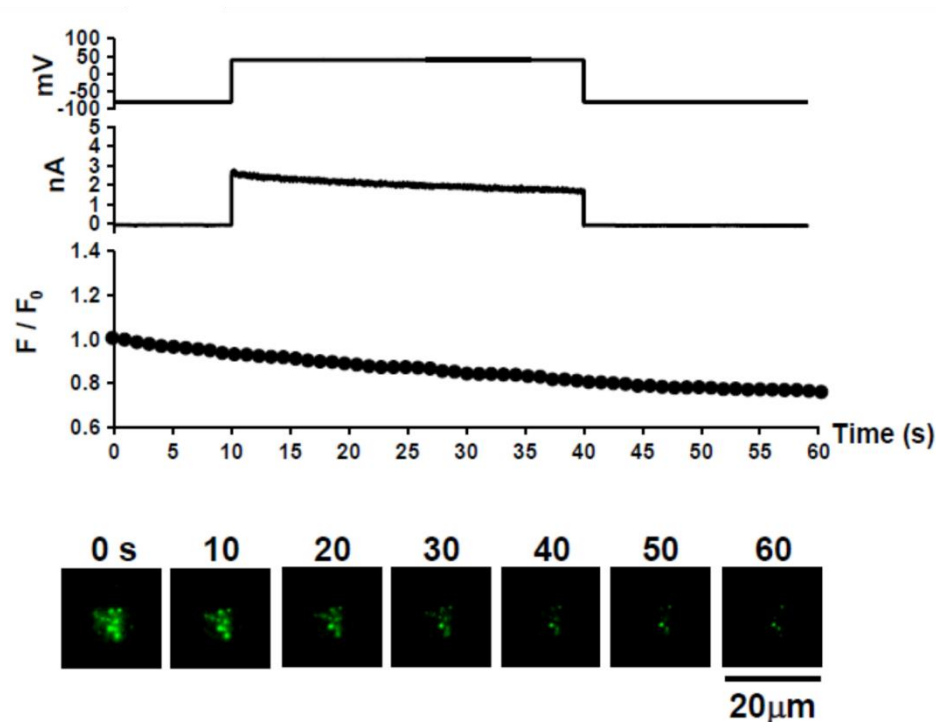


**Figure 4-3-2.** Confocal microscopic images of HeLa cells transfected with HaloTag-hBK $\alpha$ , wildtype hBK $\alpha$  and mCherry. The cells were incubated with 2  $\mu$ M TSH in DMEM at 25 °C for 30 min, and then with 1  $\mu$ M A660halo in HBSS at 37 °C for 30 min. Imaging was performed in HBSS. Green(mCherry):  $\lambda_{ex}$  = 543 nm HeNe laser 40%,  $\lambda_{em}$  = 580-650 nm, PMT, gain = 800. Red (A660halo):  $\lambda_{ex}$  = 633 nm (HeNe laser 40%),  $\lambda_{em}$  = 690-780 nm, HyD, gain = 100. Scale bar: 100  $\mu$ m

はじめから Alexa660halo で染色した場合と違い、細胞膜上において Alexa660halo 由来の蛍光はほとんど観察されなかった。このことから、少なくとも TLShalo は細胞膜上の HT-BK $\alpha$  と結合はしているものの、蛍光シグナルとして検出されていないことが示唆された。TLShalo は HaloTag と 1:1 で結合するため、HaloTag の発現量に色素の量が規定されてしまう。さらにチャンネル自身の発現量が低いことと、TLShalo の輝度が低いことが相まって検出が難しくなっていると考えられる。細胞種を HEK、Cos7、U2OS と変更し、遺伝子導入後の培養時間を 48 時間と長くとっても大きな変化は見られなかった。

一方で、TIRF 顕微鏡で観察することで自家蛍光などの影響が除かれ観察が可能になることを期待し、名古屋市立大学の山村寿男准教授のご協力を得て、パッチクランプ法 (Whole cell clamp) を用いた実験を行った。一過性に sp-HT-BK $\alpha$  を発現させ、TLShalo で標識した HEK293 細胞において、パッチクランプ法を用いて電圧を印加した際に BK チャネルの開口に伴う蛍光シグナルの即時的な上昇がみられるかについて検討した (Figure 4-3-3)。





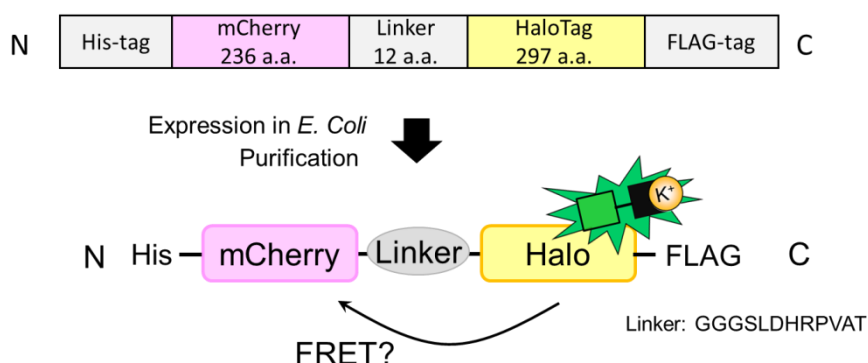
**Figure 4-3-3.** Confocal microscopic images and fluorescent intensity transition of HEK 293 cells during voltage application. The cells were transfected with sp-HT-gg-BK $\alpha$  and labeled with 1  $\mu$ M Alexa488halo. Dichroic mirror:495 nm  $\lambda_{em}$ = 500-545 nm

結果、細胞底面における目立った蛍光強度の上昇は観察されず、継時的な褪色が観察されたのみであった。電流の記録より、BK チャンネルは確かに発現しており、また電圧の印加に応じて電流は流れているため BK チャンネル近傍に K<sup>+</sup>が流出していることは間違いないと考えられる。以上の実験結果を考慮すると、主に sp-HT-BK $\alpha$ の発現量の少なさと TLSHalo の蛍光強度の低さによって、sp-HT-BK $\alpha$ に標識された TLSHalo の蛍光観察自体が現時点では困難であることが示唆された。チャンネル近傍の TLSHalo の存在量を増やす手段としては、例えば N 末端の tag に対する抗体に K<sup>+</sup>プローブを複数標識したものを用いるなどの方法が考えられるものの、第二章で検討したように抗体への標識は K<sup>+</sup>プローブの光学特性に影響を与える可能性が高く、また抗体ごとの標識分子数にもばらつきが生まれるため、良好な性質を示す複合体を得るには試行錯誤を重ねる必要があり、今後の検討課題とした。

#### 第四節 内部標準および FRET acceptor としての蛍光タンパク質の利用

第二章 Figure2-3-11 で Alexa660halo の K<sup>+</sup>非依存的な蛍光を volume marker として利用する測定法について述べたが、HaloTag タンパク質は HaloTag ligand と 1:1 の複合体を形成するため、チャンネルを直接 K<sup>+</sup>プローブで標識する場合など、より微視的な視点では異なるタンパク質分子を標識するという点で内部標準として十分ではない。一方、HaloTag タンパク質に蛍光タンパク質が融合していれば、厳密に 1 つのタンパク質に対して内部標準となる蛍光を持たせることができ、発現の様子や局在を追うことも容易となる。さらには、標識した際にプローブから蛍光タンパク質へ FRET（以下に詳述）が観測されれば、K<sup>+</sup>プローブ励起に伴う蛍光タンパク質由来の蛍光の増大を観測することで未反応の K<sup>+</sup>プローブ由来のノイズを軽減でき、結果として未反応のプローブを洗浄せずに観察を行うことが可能となる。これは洗浄操作などに弱い生体サンプルへの適用などを考えた際には非常な利点となる。

このような測定系の開発にあたっては、プローブと蛍光タンパク質との間でどの程度 FRET が起こるかが重要となる。そこで、赤色蛍光タンパク質 mCherry と HaloTag タンパク質とをリンカーでつないだ Figure 4-4-1 に示すようなタンパク質を設計・作製し、これに Tp<sup>H</sup>halo を標識した際の FRET の有無について検討した。



**Figure 4-4-1.** Construct of mCherry-HaloTag fused protein.

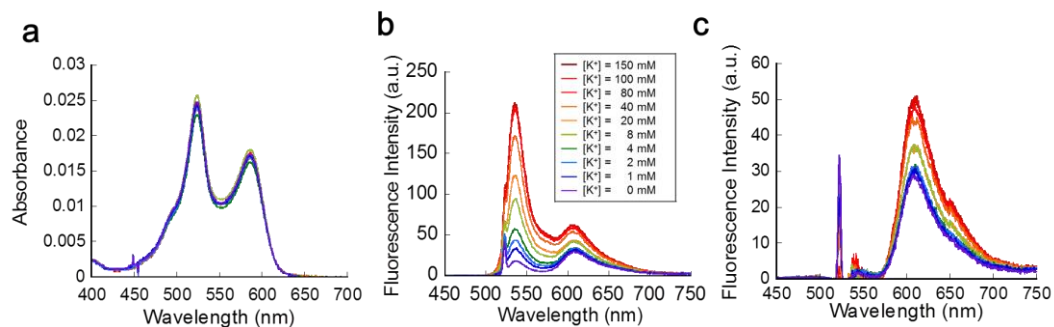
なお FRET (Förster Resonance Energy Transfer) とは、一方 (Donor と呼ぶ) の蛍光スペクトルと他方 (Acceptor と呼ぶ) の励起スペクトルに重なりがあるような 2 種類の蛍光物質が近傍に存在する場合に、励起された Donor が持つエネルギーが Acceptor へ移動することによって Acceptor 由来の蛍光が観察される現象をいう。その効率は Figure 4-4-2 に示す式 (Förster theory) によって決定され、Donor と Acceptor の間の距離、配向定数、Donor の蛍光スペクトルと Acceptor の励起スペクトルの重なり積分の 3 つの要素による。

$$k_T = \frac{9000 (\ln 10) Q_D \kappa^2 J}{128 \pi^5 N n^4 \tau_D R^6}$$

$k_T$ : エネルギー移動速度定数  
 $Q_D$ : Donor の蛍光量子収率 (Acceptor 非存在下)  
 $\kappa^2$ : 配向定数  
 $J$ : 重なり積分  
 $N$ : アボガドロ定数  
 $n$ : 溶媒の屈折率  
 $\tau_D$ : Donor の蛍光寿命 (Acceptor 非存在下)  
 $R$ : Donor と Acceptor の距離

**Figure 4-4-2.** Förster Theory

TLSHalo と得られたタンパク質との複合体の光学特性を精査した (Figure 4-4-3)。



**Figure 4-4-3.** (a) Absorption and (b) emission ( $\lambda_{\text{ex}}=522$  nm) spectra of 1  $\mu\text{M}$  TLSHalo-HaloTag-mCherry complex in PBS (pH 7.4) containing indicated  $[\text{K}^+]$ . (c) mCherry-derived emission spectra calculated from (b). TLSHalo-derived fluorescence was subtracted from emission spectra of TLSHalo-HaloTag-mCherry complex ( $\lambda_{\text{ex}}=522$  nm)

吸光スペクトルより、プローブと HaloTag タンパク質はほぼ 1:1 の割合で結合していることが示唆された。また蛍光スペクトルにおいて、522 nm での励起によって TLSHalo の蛍光が K<sup>+</sup>濃度の増加に応じて増加した一方、全体のスペクトルから TLSHalo 由来の成分を除いた mCherry 由来の蛍光も微弱ながら K<sup>+</sup>濃度増加に応じて 1.5 倍程度に上昇していた。すなわち、mCherry の蛍光を内部標準とした 2 波長励起 2 波長蛍光での測定により光の当たり方やプローブの濃度差の影響を打ち消し、より正確な測定が可能となることに加えて、1 波長励起 2 波長蛍光での測定による未洗浄での蛍光観察の実現にも期待が持てる結果と言える。

今後適切な蛍光タンパク質の選択、HaloTag タンパク質と蛍光タンパク質の間のリンカー構造の最適化による FRET 効率の向上やチャネルタンパク質への導入が実現できれば、より有用な検出系の構築が期待される。

## 第五章

より高次な系における  $K^+$ 濃度変化の  
検出を指向した新規  $K^+$ プローブの  
開発検討

## 第五章 より高次の系での K<sup>+</sup>検出を指向した 2 光子励起 K<sup>+</sup>プローブの開発研究

### 第一節 2 光子励起顕微鏡を用いた K<sup>+</sup>イメージングの意義

K<sup>+</sup>が様々な生命現象に関わることは古くから知られているが、例えば近年、神経ネットワークにおいて細胞外の[K<sup>+</sup>]変化が単一細胞での活動電位の伝播のみならず細胞間の同期や情報伝達にも関連することが示唆されていたり<sup>2,5</sup>、また血管内皮細胞と平滑筋細胞との間隙における血管弛緩因子としての役割を K<sup>+</sup>が担っているという報告があるなど<sup>9</sup>、その時空間的な挙動や役割に関しては未解明な部分も多い。従って局所的な[K<sup>+</sup>]の変化を動的に可視化する技術の開発は、このような未だ議論の渦中にある生命現象の解明に大きく貢献できる。

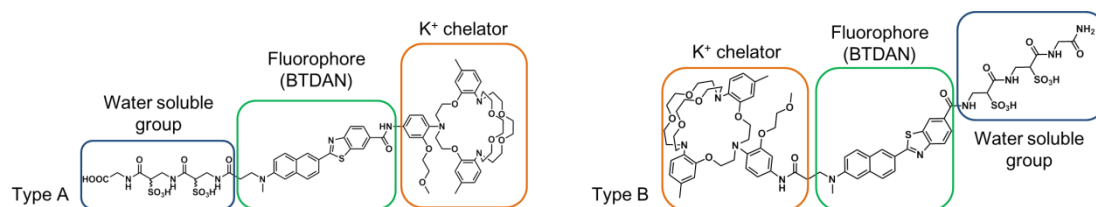
これらの生命現象を K<sup>+</sup>プローブを用いて観察するためには、培養細胞系に留まらず組織や個体レベルでの使用に耐える K<sup>+</sup>プローブの開発が必須である。これまで Verkman らによって Tetramethylrhodamine を母核とする K<sup>+</sup>プローブ TAC-Red を用いたマウス脳表面での K<sup>+</sup> wave の観察や<sup>24</sup>、Dextran に結合した K<sup>+</sup>プローブを用いたマウス気管表面での K<sup>+</sup>イメージングが報告されているが<sup>31</sup>、前者は一部のプローブの細胞膜透過、後者は低い蛍光量子収率といった問題点を有しており、また生体深部での観察は難しいと考えられる。

実際に、論文既知化合物である TAC-Lime<sub>dex</sub> を用いて脳スライスでの K<sup>+</sup>検出を試みたところ、蛍光強度は弱く、自家蛍光や光褪色の影響により明瞭なシグナルを得ることは難しかった。また 2 光子励起では蛍光はごく微弱であり観察は困難だった。

そこで、2 光子励起に適した細胞外滞留型の K<sup>+</sup>プローブを開発することで、これらの問題点を克服し、これまで観察が難しかった脳スライス等における K<sup>+</sup>の時空間的な挙動が明らかにできると考えた。方針としては、2 光子励起の効率が高いと報告されている BT DAN ( $\Phi\delta = 80\sim 140$  GM ( $\lambda_{ex} = 800$  nm) vs. 20-30 GM ( $\lambda_{ex} = 800$  nm, fluorescein)) を蛍光母核とし<sup>61,62,38</sup>、K<sup>+</sup>キレーターと水溶性部位を備えた K<sup>+</sup>プローブを設計・合成し、脳スライスにおける K<sup>+</sup>の動態観察を目標とした。

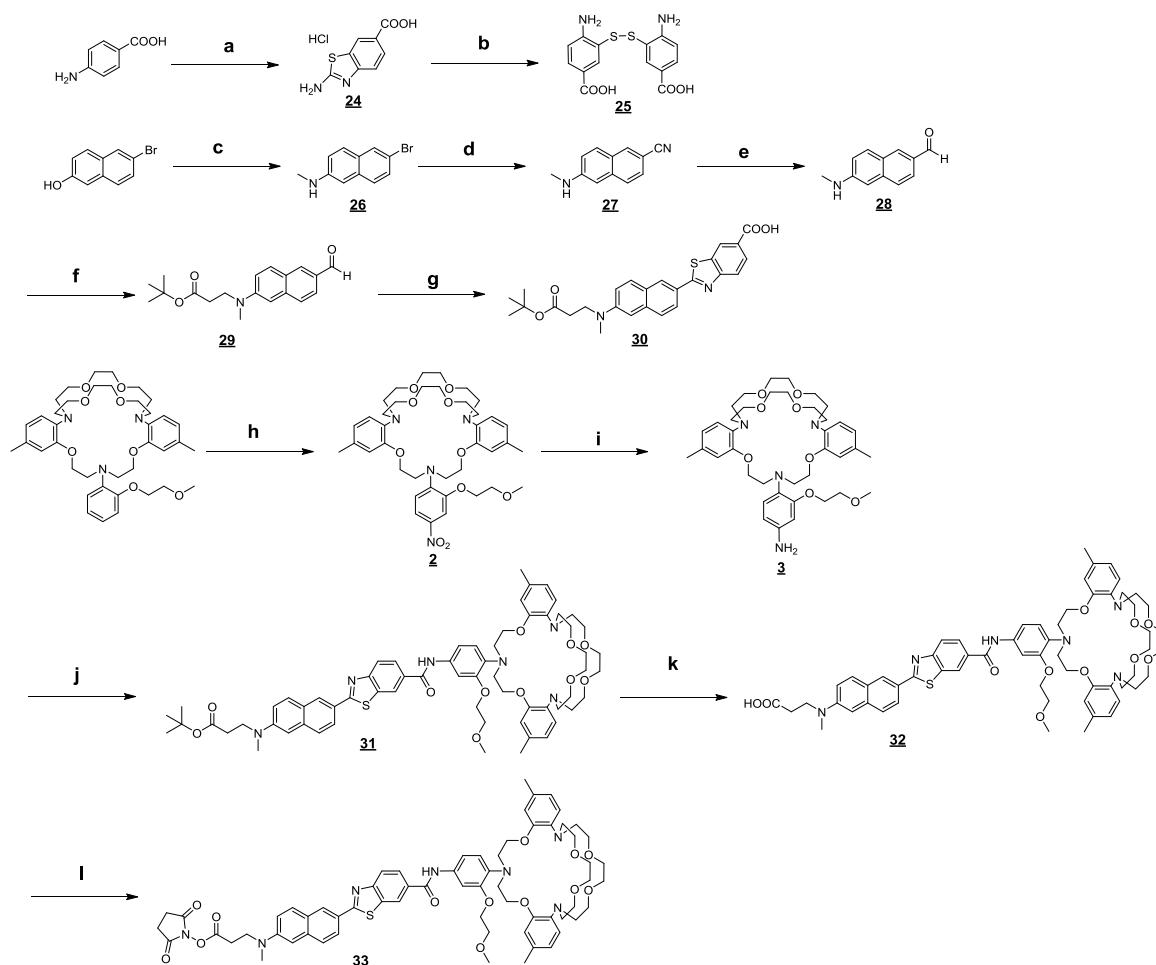
## 第二節 2光子励起に適した蛍光団を持つK<sup>+</sup>プローブの設計・合成と評価

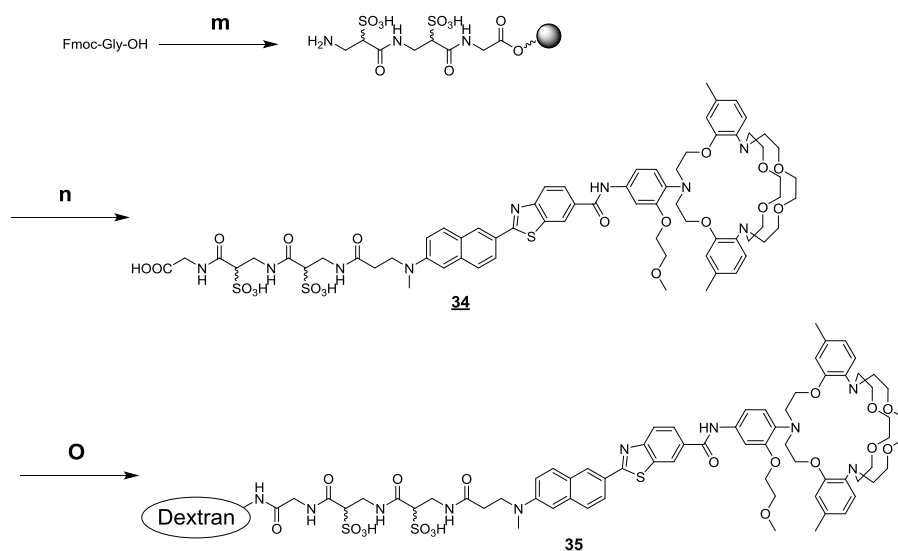
具体的な K<sup>+</sup>プローブの設計を以下に示す (Figure 5-2-1)。



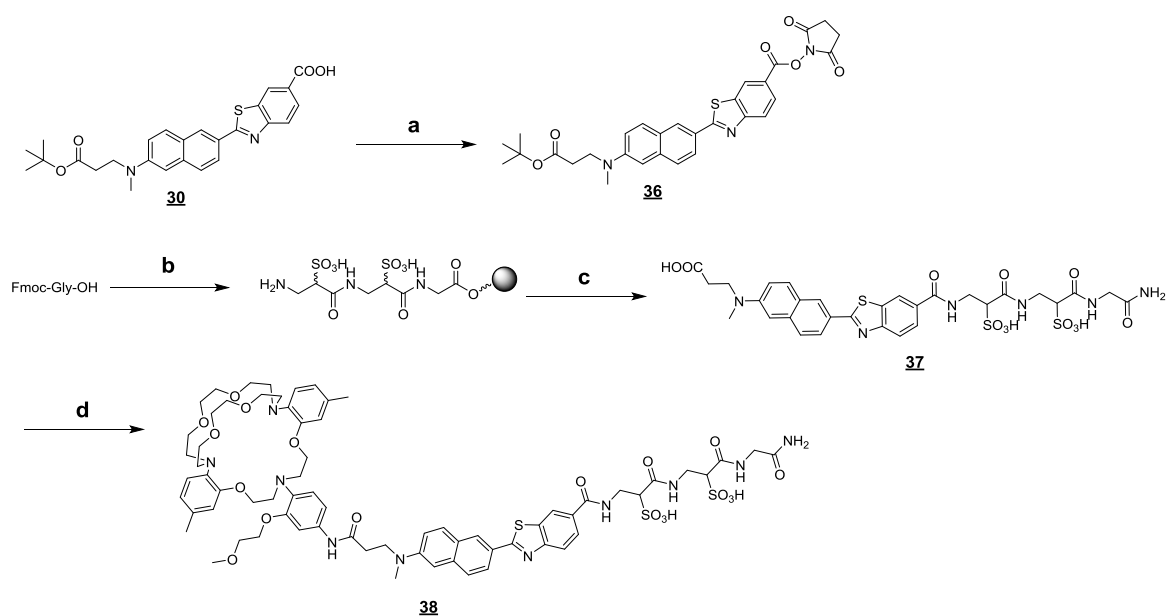
**Figure 5-2-1.** The design of two-photon  $K^+$  probes.

Cho B.R.らの報告<sup>61, 62</sup>を参考に、BTDANを骨格としてその両側にK<sup>+</sup>認識部位と細胞外滞留性を付与するための親水性部位を結合させた分子を設計し、合成に着手した。





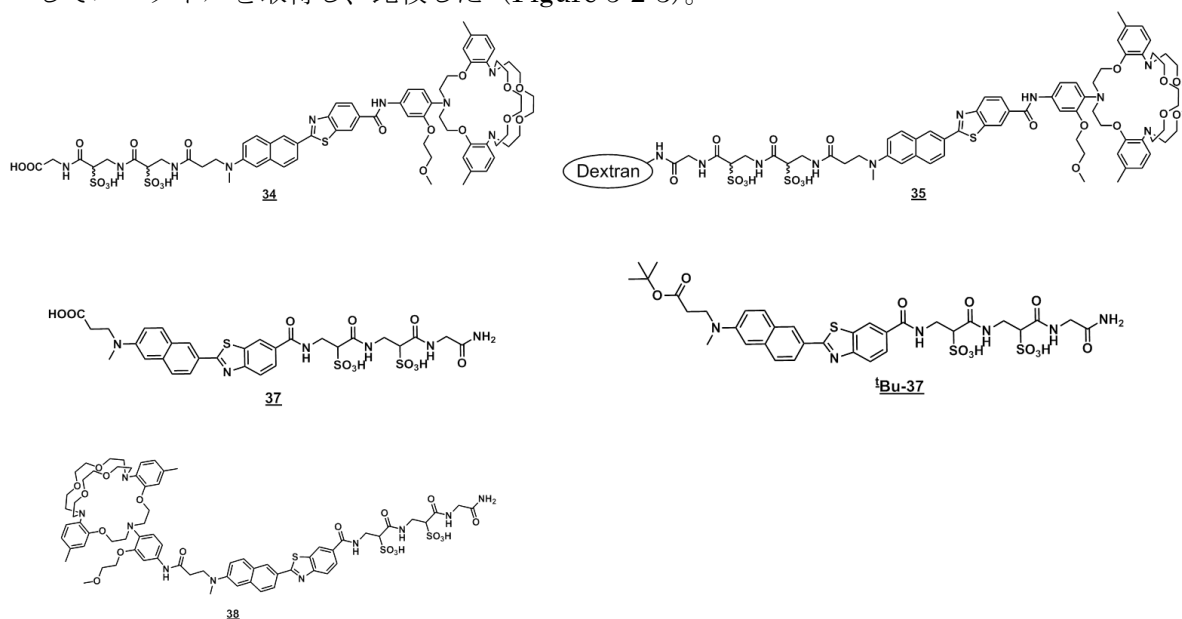
**Scheme 5-2-1.** Synthesis of **34** and **35**. (a) (i) NaSCN, Br<sub>2</sub>, MeOH (ii) 1 N HCl aq. y. 27% (b) (i) KOH, H<sub>2</sub>O (ii) conc. HCl y. 36% (c) Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, CH<sub>3</sub>NH<sub>2</sub> · HCl, NaOH, H<sub>2</sub>O y. 50% (d) CuCN, pyridine y. 38% (e) DIBAL, toluene y. 98% (f) *t*-butyl 3-bromoapropionate, protone sponge, CH<sub>3</sub>CN y. 76% (g) **25**, DMF y. 28% (h) HNO<sub>3</sub> aq., H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> aq., AcOH y. 43% (i) **30**, H<sub>2</sub>, 10% Pd/C, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y. 54% (j) **30**, HATU, DIEA (k) TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y. 21% (in two steps) (l) NHS, WSCD, DIEA, DMF (m, n) 2-chlorotrityl resin, Fmoc- $\alpha$ -sulfo- $\beta$ -alanine (o) DMT-MM, amino dextran, borate buffer.



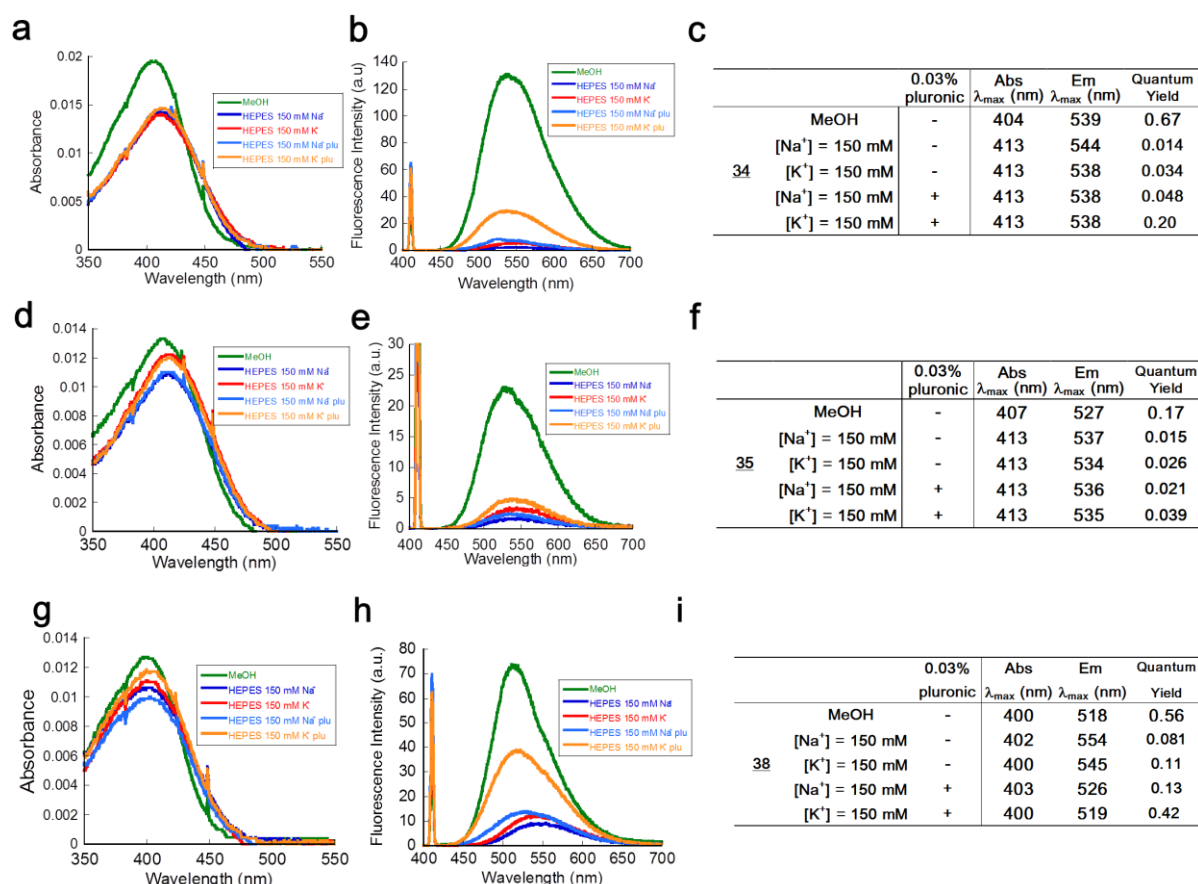


**Scheme 5-2-2.** Synthesis of **38**. (a) NHS, WSCD, DIEA, DMF, crude (b) Link-amide resin, Fmoc- $\alpha$ -sulfo- $\beta$ -alanine, HATU, DIEA, DMF peptide solid-phase synthesis (c) **36**, DIEA, DMF (ii) TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y. 21% (2 steps, fluorophore based) (d) HATU, **3**, DIEA, DMF y. 17%

合成し、測定を行った各化合物の構造を以下にまとめた (Figure 5-2-2)。全体の傾向として、緩衝液中では蛍光量子収率が低く、K<sup>+</sup>を添加しても蛍光強度の増大はわずかだった。界面活性剤を少量添加することで K<sup>+</sup>濃度依存的な蛍光上昇が見られたため、神経細胞や脳切片に対し Ca<sup>2+</sup>プローブを負荷する際に用いる分散剤である pluronic F-127 を 0.03% 添加してスペクトルを取得し、比較した (Figure 5-2-3)。



**Figure 5-2-2.** Structure of developed probes.



**Figure 5-2-3.** Absorption, emission ( $\lambda_{\text{ex}}=410$  nm) spectra and optical properties of 1  $\mu\text{M}$  each compound in MeOH or 5 mM HEPES (pH 7.0) containing indicated concentration of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and pluronic. The mixture contained 0.5% (without pluronic) or 0.65% (with pluronic) DMSO as a cosolvent. (a,b) absorption (a) and emission (b) spectra of **34**. (d,e) absorption (d) and emission (e) spectra of **35**. (g,h) absorption (g) and emission (h) spectra of **38**. (c,f,i) optical properties of each K<sup>+</sup> probe. For determination of the quantum efficiency of fluorescence, coumarin 307 in MeOH ( $\Phi=0.95$ ) was used as a fluorescence standard

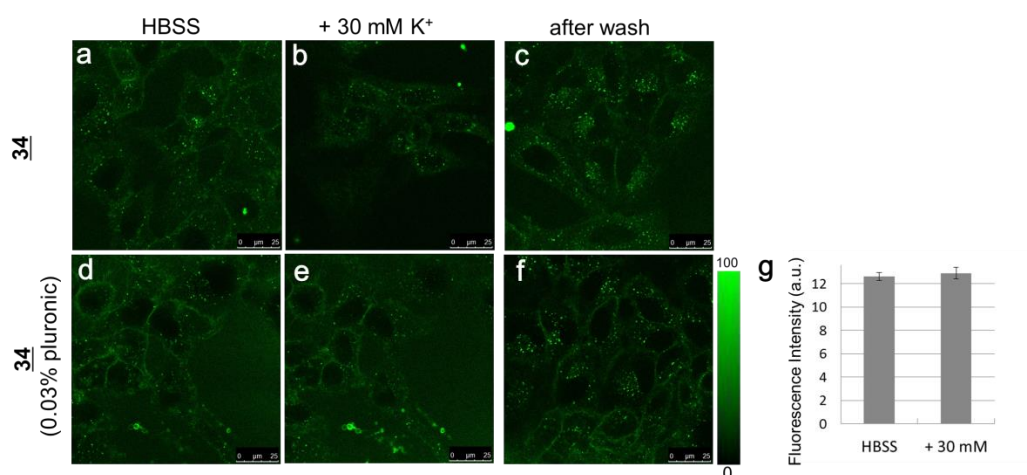
HEPES buffer 中、[Na<sup>+</sup>]=150 mM と [K<sup>+</sup>]=150 mM で蛍光強度を比較している。**34** の K<sup>+</sup> の濃度上昇に伴う蛍光量子収率の変化は 2.4 倍に留まり、最大値も 3.4% と低かった。一方、pluronic F-127 存在下での蛍光量子収率の変化は 4.8% から 20% (4.2 倍) と、伸び率・最大値共に向上した。なお **34** を dextran (ave. M.W.10000) に結合させた **35** では蛍光量子収率は減少し、どの条件においても **34** の 4 分の 1 程度にとどまった。

キレーターと水溶性部位の位置を入れ替えた **38** については、緩衝液中では  $K^+$  添加に伴う蛍光量子収率の変化は 1.4 倍程度であったが、pluronic F-127 存在下での蛍光量子収率の変化は 13% から 42% (3.2 倍) と、伸び率・最大値共に向上した。

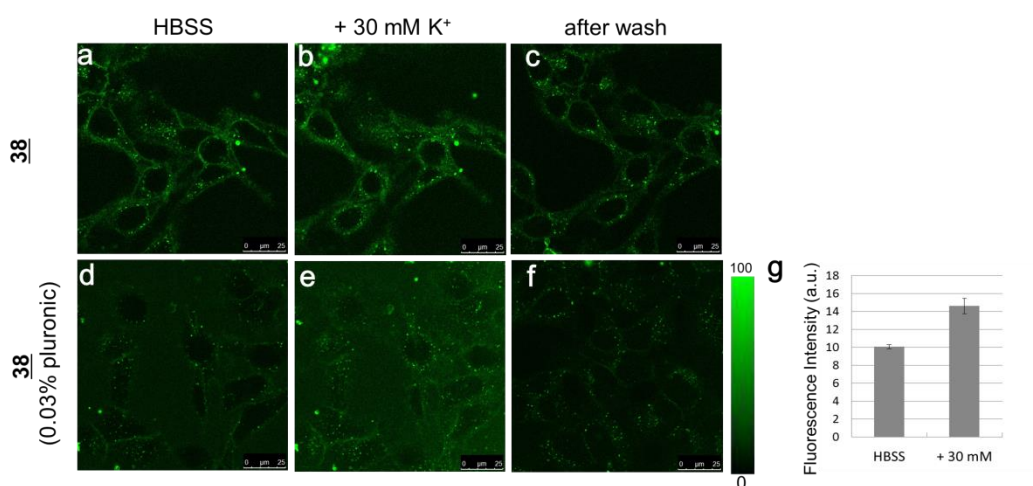
in vitro の結果をまとめると、**34, 38** はともに緩衝液中では  $K^+$  濃度に応じた蛍光強度変化がわずかであり、 $K^+$  プロブとしては残念ながら実用的でなかったが、pluronic F-127 添加により **34, 38** ともに  $K^+$  濃度変化への応答性・最大蛍光量子収率が改善された。蛍光量子収率の伸び率は 3-4 倍程度と、既存の  $K^+$  プロブと比べて低く留まっているものの、深部観察が必要な場合など実験系次第では有用なものになる可能性がある。

#### 細胞系における局在

続いて、各化合物を培養細胞に負荷した際の局在について検討した (Figure 5-2-4, 5-2-5)。理想としては、細胞に取り込まれず細胞外に拡散した状態か、もしくは細胞表面に局在した状態で  $K^+$  プロブとして機能することを想定している。10% FBS を含む DMEM 中ではタンパク質への非特異的な吸着により  $K^+$  の有無に関らずプロブが高蛍光性になったため、細胞外液として HBSS を用いている。



**Figure 5-2-4.** Confocal microscopic images of HeLa cells loaded with 5  $\mu\text{M}$  **34**. Imaging was performed in HBSS with or without 0.03% pluronic. Green:  $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 450\text{-}600 \text{ nm}$ , gain= 800. Bright Field: gain= 350. Scale bar: 25  $\mu\text{m}$



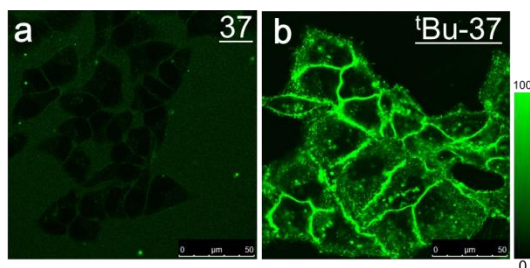
**Figure 5-2-5.** Confocal microscopic images of HeLa cells loaded with 5  $\mu\text{M}$  **38**. Imaging was performed in HBSS with or without 0.03% pluronic. Green:  $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 450\text{-}600 \text{ nm}$ , gain= 800. Bright Field: gain= 350. Scale bar: 25  $\mu\text{m}$

**34**、**38**ともに細胞へ負荷したところ、細胞膜上および細胞内に顆粒状に分布した。In vitroの結果から予想されたように細胞外液での蛍光は  $\text{K}^+$ 濃度によらず弱く、また細胞膜上および細胞内での  $\text{K}^+$ 濃度に応じた蛍光強度の変化は見られなかった。一方、pluronic F-127を0.03%加えた条件下では細胞への分布がやや減少し、特に **38**では細胞外液の蛍光強度が  $\text{K}^+$

濃度依存的に増大した（棒グラフは 0.03% pluronic F-127 添加時の細胞外液における蛍光強度）。

しかしながら、細胞外 K<sup>+</sup>イメージングのために pluronic F-127 の添加が必須であること、細胞膜および細胞内への分布によるバックグラウンド蛍光の増加が抑えられないこと、K<sup>+</sup>濃度変化に伴う蛍光強度変化の度合いが小さいことなどから、これらの K<sup>+</sup>プローブを組織切片などの実験に用いても既存のものに比べての優位性を示すのは残念ながら困難であると考えられる。

プローブの構造と細胞での局在の関連について調べるため、キレーターを結合させる前の 37 および 37 のカルボキシ基が <sup>t</sup>Bu エステル基で保護された <sup>t</sup>Bu-37 を細胞へ負荷した（Figure 5-2-6）。37 は分子の両端に親水性の置換基を持つもの、<sup>t</sup>Bu-37 は分子の一方に脂溶性の構造、他方に親水性の構造が分布した K<sup>+</sup>プローブ 34, 38 と同様の構造のモデルとして用いた。



**Figure 5-2-6.** Confocal microscopic images of HeLa cells loaded with 5  $\mu$ M each probe. Imaging was performed in HBSS. Green:  $\lambda_{\text{ex}}$  = 405 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 450-600 nm, gain = 800. Bright Field: gain = 350. Scale bar: 50  $\mu$ m

37 は HBSS 中において優れた細胞外滞留性を示した。一方、<sup>t</sup>Bu エステルを脱保護していない <sup>t</sup>Bu-37 は細胞膜に強い局在を見せた。細胞外に一様に分布するには、特に分子全体の形状として分子の一部ではなく全体的に水溶性置換基が分布していることが望ましいことが示唆される。

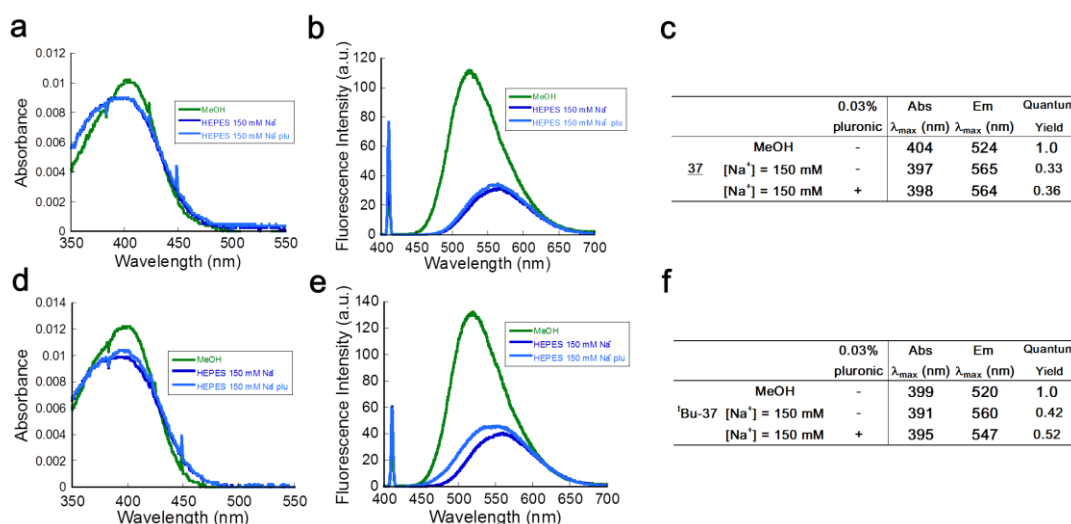
## 緩衝液中での機能の改善に向けた考察

今回開発した BT DAN を蛍光団に持つ  $K^+$ プローブは、期待に反して緩衝液中で蛍光量子収率は低く留まり、十分な  $K^+$ 応答性を示さなかった。主な原因として、

- ①水溶性が低く、分子が凝集することで機能しなくなっている、または
- ② $K^+$ の配位によっても PeT による消光が解除されていない

の 2 つが考えられたため、これらについて検討を行った。

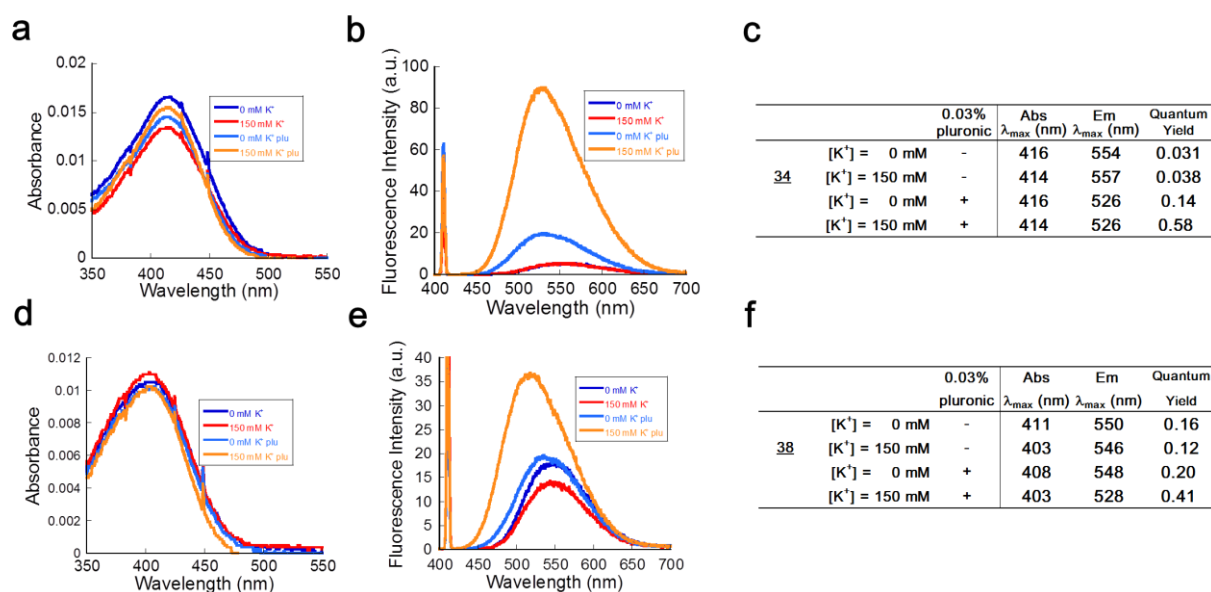
まず①について検討するため、キレーターを結合させる前の **37** および  $t$ Bu-**37** の緩衝液中の光学特性を調べた (Figure 5-2-7)。



**Figure 5-2-7.** Absorption, emission ( $\lambda_{ex}=410$  nm) spectra and optical properties of 1  $\mu$ M compound **37** and  $t$ Bu-**37** in MeOH or 5 mM HEPES (pH 7.0) containing indicated concentration of Na<sup>+</sup> and pluronic. The mixture contained 0.5% (without pluronic) or 0.65% (with pluronic) DMSO as a cosolvent. For determination of the quantum efficiency of fluorescence, coumarin 307 in MeOH ( $\Phi=0.95$ ) was used as a fluorescence standard.

**37**、**tBu-37**ともに、緩衝液中でも 30-40%の蛍光量子収率を示した。**tBu-37**では、pluronic F-127 添加によって蛍光スペクトルの短波長化と蛍光量子収率の上昇が見られた。**37**でも同様の傾向はあるものの変化の程度は小さい。これは、一方に脂溶性の構造、他方に親水性の構造を持つような分子構造を持つ場合には緩衝液中で一部凝集体のような構造をとり、これが分散剤の添加によって解消されている、という推測に沿った結果と言えるが、**37**と **tBu-37**を比較した場合には、そのような現象による蛍光特性への寄与は小さいともいえる。

また、②の可能性を検討するため、キレーターの窒素原子がプロトン化されると考えられる pH 5.5 の NaPi buffer 中での蛍光強度を測定した (Figure 5-2-8)。



**Figure 5-2-8.** Absorption, emission ( $\lambda_{ex}$  = 410 nm) spectra and optical properties of 1  $\mu$ M compound **34** and **38** in 100 mM NaPi (pH 5.5) containing indicated concentration of K<sup>+</sup> and pluronic. The mixture contained 0.5% (without pluronic) or 0.65% (with pluronic) DMSO as a cosolvent. For determination of the quantum efficiency of fluorescence, coumarin 307 in MeOH ( $\Phi$  = 0.95) was used as a fluorescence standard

**34**、**38**ともに pH7.0 の HEPES 緩衝液中と同様の吸収・蛍光波長を示すことから、蛍光団のアミンへの影響はないと考えられる。

pH 5.5 の条件ではわずかに蛍光量子収率が上昇しているものの、キレーターのない **37** や **tBu-37** と比べると低い値にとどまっており、第二章で検討した TBEs の場合と違ってプロトンの配位によってもなお十分な蛍光量子収率の回復は見られなかった。なお分散剤である pluronic F-127 などの界面活性剤の添加時や有機溶媒中では比較的高い蛍光を発した。またより強い酸性条件下では蛍光団のアミンのプロトン化により PeT の影響を判断することとは難しかった。

上記の結果から考えられる可能性として、凝集体の形成等の原因で蛍光特性が影響を受けている、または色素の性質上緩衝液中では  $K^+$ 、 $H^+$  のどちらの配位によっても蛍光が回復しない程度に強く消光されており、pluronic F-127 の添加による環境の変化によって消光の度合いが変化したことが考えられる。現時点では行えていないものの、さらに検討するならば、前者については DLS（動的光散乱）の測定による粒子径の計測、後者については Cyclic Voltammetry を用いたキレーターの酸化電位および色素の還元電位の計測などが手段として考えられる。

以上のように、**34**、**38** の緩衝液中での機能に影響する要因は複雑であり、残念ながら今回明確な結論を得て実用的な 2 光子励起に適した  $K^+$  プロブを開発するには至らなかった。しかしながら先述の仮説に基づいた対策としては、分子の複数個所に親水性官能基を分布させ界面活性剤様の構造を避けた分子設計や、キレーターと色素の酸化還元電位測定の結果に基づいた分子設計を行うことで機能を改善できる可能性がある。また、論理的な予測は難しいものの、キレーター部分への親水性置換基の導入により、蛍光団を含む疎水性部位のみが細胞膜に親和し、キレーター部位が細胞膜外側に露出するような構造にすることで、細胞膜上で機能させることも出来る可能性がある<sup>38</sup>。生体サンプルにおける高精度な  $K^+$  イメージングが実現すれば生命科学の理解を深めるのに大きく貢献することは疑いがないため、今後の検討課題としたい。



## 第六章

### 総括と今後の展望

## 第六章 総括と今後の展望

### 総括

本研究において、私は  $K^+$  認識能、タンパク質との結合特性および細胞膜非透過性といった多くの機能の最適化を伴う有機小分子蛍光プローブの精密な設計・合成により、細胞膜近傍で起こる  $K^+$  濃度変化をリアルタイムで選択的に検出可能なタンパク質複合型  $K^+$  プローブ TLSHalo の開発に初めて成功した。また、これを用いてチャネル活動や細胞間隙のモデルとなる系における  $K^+$  濃度変動を可視化可能であることを示した。同成果は細胞膜局在型の  $K^+$  プローブを用いることでより高次の生体サンプルにおける  $K^+$  ダイナミクスを観測できる可能性を拓くものである。

さらに、同プローブを用いて  $K^+$  チャネルの一種である BK チャネルの開口部近傍に結合した HaloTag タンパク質を標識することで、チャネル活動に伴う  $K^+$  流出の直接的な可視化に関して基礎的な知見を得た。また組織切片や生体内での  $K^+$  イメージングを指向して、2 光子励起に適した蛍光団を持つ新規  $K^+$  プローブの開発を試みた。これらは残念ながら実現には至らなかったものの、現状の  $K^+$  プローブの適用限界と今後の改良の方向性を示せたのは研究発展の大きな一助であると考えている。

$K^+$  は細胞内に最も豊富に存在し、活動電位の制御をはじめとして様々な生命現象に関わる非常に重要な金属イオンであるにも関わらず、 $Ca^{2+}$  など蛍光プローブが充実する他の金属イオンに比べて動態観察の手法が圧倒的に未発達であり、その時空間的な挙動についての理解は遅れているのが現状である。本研究の成果がそのような現状を一步でも改善し、生命の根源となる現象の理解に繋がっていくことを期待したい。

## 今後の展望

本研究で開発した K<sup>+</sup>チャネル活性検出系及び開発で得た知見は、今後以下のような様々な用途へ応用可能である。

### ・活動電位発生に伴う細胞表面における K<sup>+</sup>濃度変化の検出

以前に共同研究の一端として、「iPS 由来心筋細胞の細胞表面における、自発的収縮に伴う K<sup>+</sup>流出の蛍光検出」について初期検討を行った。当時は系の設定や測定・解析技術が未熟であり時間も限られていたために芳しい結果を得られなかったものの、少なくとも Alexa660halo を volume marker とするなど、今後はより詳細な解析が可能になると考えられる。仮にこのような K<sup>+</sup>流出が蛍光検出できるのであれば、それに立脚して各種の K<sup>+</sup>チャネルの発現量の違いが蛍光変化において何らかの違いとして観察されるか、その違いによって分化誘導において混入した neuron や nodal type の細胞と心筋細胞とを区別することが出来るか、など、幹細胞研究を進展させる知見を得られる可能性がある<sup>63,64</sup>。

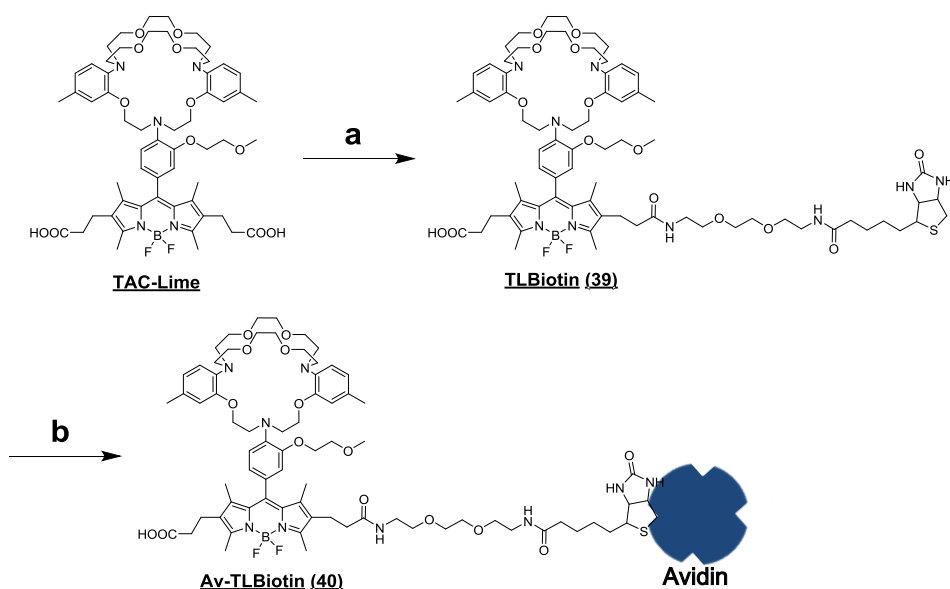
### ・プローブの物性及び機能の改良

キレーター部分の性能は K<sup>+</sup>プローブの機能に決定的な影響を与える因子である。近年、TAC キレーターの簡便な合成経路の開発が報告されたこともあり<sup>26</sup>、K<sup>+</sup>キレーターへの水溶性置換基導入によるプローブ全体の親水性向上や、電子供与性基導入による K<sup>+</sup>検出感度の上昇、電子求引性基導入による細胞内 K<sup>+</sup>濃度測定に適した弱い親和性を持つ K<sup>+</sup>プローブの開発なども将来的には可能と考えられる。また 2 光子励起 K<sup>+</sup>プローブの設計に関しても、界面活性剤様の構造を避けることが望ましい、という知見は実用的な K<sup>+</sup>プローブの合成につながると考えられる。

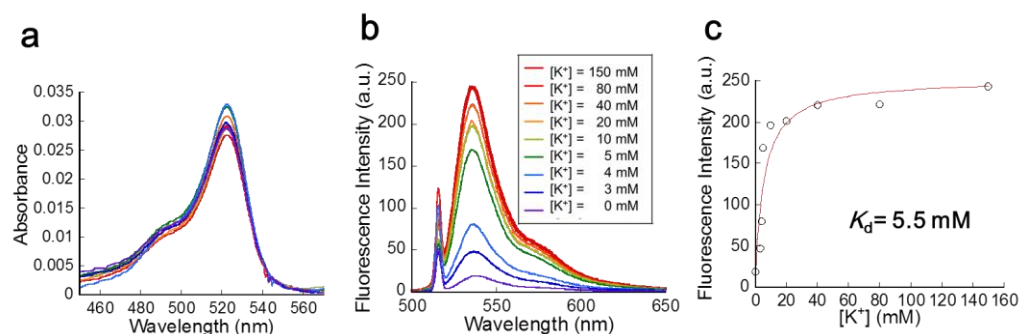
・遺伝子導入不要な細胞膜局在  $K^+$ プローブの開発

今回開発した測定系では、HaloTag タンパク質を用いることで標識前後の光学特性の変化を抑え、また狙った細胞の膜上だけに  $K^+$ プローブを標識できるといった利点をもたらすことができた。しかし一方で、組織以上の高次な生体サンプルには適用が難しい、プローブ量がタンパク質の発現量に規定されるため得られる輝度に限界がある、などの問題点も生じた。すなわち、標的とする観察対象によって使い分けが可能な、遺伝子導入を要さない細胞膜局在  $K^+$ プローブの開発も同時に望まれる。

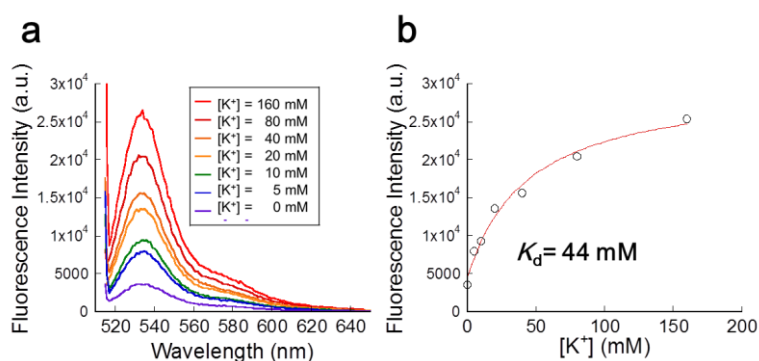
第二章においてこれらの検討を行い、今回は中断したものの設計次第では実現の可能性は残されていると考える。その一端として、研究を進めるうえで得た知見を基に avidin 標識  $K^+$ プローブの細胞膜局在を見直してみた。具体的には、TAC-Lime にリンカーとしてエチレングリコール構造を介して biotin を結合させた化合物を用いることで、プローブをタンパク質表面から遠ざけ、光学特性の変化を抑えられるかについて検討した。



**Scheme 6-1.** Synthesis of TLBiotin. (a) TACLimeSE, Biotin-PEG<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, PBS y. 40% (b) avidin, PBS



**Figure 6-1.** (a) Absorption and (b) emission ( $\lambda_{\text{ex}} = 515$  nm) spectra of 1  $\mu\text{M}$  TLBiotin in 5 mM HEPES buffer (pH 7.0) containing indicated  $[\text{K}^+]$  and 0.2% DMSO as a cosolvent. Ionic strength was maintained at 150 mM by addition of NaCl. (c) Fluorescence intensity of TLBiotin as a function of  $\text{K}^+$  concentration.



**Figure 6-2.** (a) Emission ( $\lambda_{\text{ex}} = 490$  nm) spectra of 1  $\mu\text{M}$  Av-TLBiotin in PBS (pH 7.4) containing indicated  $[\text{K}^+]$ . (b) Fluorescence intensity as a function of  $\text{K}^+$  concentration.

**Table 6-1.** Optical properties of Av-TLBitin.

		Abs	Em	Quantum
		$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	Yield
TLBiotin	$[\text{Na}^+] = 150$ mM	525	536	0.014
	$[\text{K}^+] = 150$ mM	525	536	0.29
Av-TLBiotin	$[\text{Na}^+] = 150$ mM	525	537	0.018
	$[\text{K}^+] = 150$ mM	525	539	0.14

直接 SE 体を結合させた場合(Table 2-2-2-1)に比べて蛍光量子収率の全体的な低下は抑えられ、 $K^+$ に対する応答能も保たれていた。

また細胞表面に予め biotin を結合させれば、avidin 自体は本来細胞膜への集積能を持たないような細胞に対しても応用が可能と考えられる。

現時点では同複合体の細胞や生体サンプルへの応用は検討できておらず、担体となるタンパク質にも最適化の必要はあるものの、 $K^+$ プローブと結合部位との間のリンカー構造を適切に設定することで、遺伝子導入不要な細胞膜局在  $K^+$ プローブの開発も可能となることが期待される。

## 第七章

### 実験の部

## 第七章 実験の部

**Materials.** General chemicals were of the best grade available, supplied by Tokyo Chemical Industries, Wako Pure Chemical, Aldrich Chemical Co, Dojindo, Invitrogen and Promega were used without further purification. All solvents were used after appropriate distillation or purification. Silica gel column chromatography was performed by using Silica Gel 60 (spherical; Kanto Chemical, Co., Inc., Tokyo, Japan), NH silica (chromatorex; Fuji Silysia chemical LTD, Aichi, Japan) or aluminium oxide 90 (Merck, Darmstadt, German). Restriction enzymes, ligation high Ver.2, T4 DNA kinase, DNA polymerase I, large (Klenow) fragment, *E coli* alkaline phosphatase (BAP) and *E coli* JM109 were obtained from Toyobo. *E coli* BL21 (DE3), pET-3a was obtained from Novagen. Protein molecular weight standards were obtained from Invitrogen. pmCherry-C1 was obtained from Clontech. pFN18A and pFN21A was obtained from Promega. HiTrap Q HP column was obtained from GE Healthcare. BugBuster master mix was obtained from Novagen. SDS-polyacrylamide (4–20%) gradient gel was obtained from Cosmobio. PD-10 desalting column was obtained from GE Healthcare.

**General instruments.**  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded on a JEOL JNM-LA300 instrument (300 MHz for  $^1\text{H}$  NMR and 75 MHz for  $^{13}\text{C}$  NMR) or a JEOL JNM-LA400 instrument (400 MHz for  $^1\text{H}$  NMR and 100 MHz for  $^{13}\text{C}$  NMR);  $\delta$  values are in ppm relative to tetramethylsilane (TMS). Mass spectra (MS) were measured with a JEOL JMS-T100LC AccuTOF (ESI). Photoimages of gels, mCherry, and probe fluorescence were captured with a digital camera (HS EX-FC1000, Casio). HPLC analyses were performed on an Inertsil ODS-3 (4.6 $\times$ 250 mm) column (GL Sciences, Inc.) by using a HPLC system composed of a pump (PU-980, Jasco) and a detector (MD-2015 or FP-2025, Jasco) or a HPLC system composed of a pump (PU-2080, Jasco) and a detector (MD-2018 or FP-2025, Jasco). Preparative HPLC was performed on an Inertsil ODS-3 (10 $\times$ 250 mm) column (GL Sciences, Inc.) by using a HPLC system composed of a pump (PU-2080, Jasco) and a detector (MD-2015 or FP-2025, Jasco) or a HPLC system composed of a pump (PU-2086, Jasco) and a detector (MD-2018, Jasco). DNA sequence analyses were performed on an ABI PRISM 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems).



**Fluorometric analysis.** In general, UV-vis spectra were obtained on a UV-1600 (Shimadzu). Fluorescence spectroscopic measurements were performed on an F4500 (Hitachi). The slit width was 2.5 nm for both excitation and emission. The photomultiplier voltage was 700 V. For Alexa660halo, fluorescence spectroscopic measurements were performed on F7000 (HITACHI). The slit width was 10 nm for both excitation and emission. The photomultiplier voltage was 950 V. For avidin or HaloTag labeled with developed K<sup>+</sup> probe, fluorescence spectroscopic measurements were performed on SH-9000 (CORONA ELECTRIC Co.,Ltd.). All experiments were carried out at 298 K. Dyes were dissolved in DMSO as stock solutions. Dx-TLSHalo was dissolved in distilled water as stock solution. Avidin, HaloTag and those labeled with developed K<sup>+</sup> probe were dissolved in PBS (K<sup>+</sup> free) as stock solutions. Photochemical properties of compounds were examined in HEPES buffer (5 mM, pH 7.0), sodium phosphate buffer (100 mM, various pH), PBS or HEPES buffer (5 mM, pH 7.0, 40% acetonitrile) containing less than 2% (v/v) DMSO as a co-solvent. The final concentrations of dyes, DMSO, Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> are given in each Figure legend.

**Quantum yield measurements.** For determination of the relative fluorescence quantum yields ( $\Phi_f$ ), fluorescein in 0.1N NaOH aq. ( $\Phi_f = 0.85$ ) or coumarin 307 in MeOH ( $\Phi_f = 0.95$ ) was used as a standard<sup>65,66</sup>. Calculations were carried out according to Equation (1), where  $\Phi$  is the quantum yield (subscript “st” stands for the reference and “x” for the sample), A is the absorbance at the excitation wavelength, n is the refractive index, and D is the area (on an energy scale) of the fluorescence spectra. The sample and the reference were excited at the same wavelength (492 nm for fluorescein or 361 nm for coumarin 307).

$$\Phi_X/\Phi_{st} = [A_{st}/A_X][n_X^2/n_{st}^2][D_X/D_{st}] \quad (1)$$

**$K_d$  fitting.** The value of  $K_d$  was obtained by nonlinear least-squares fitting to Equation (2) based on ref.<sup>67</sup>  $K_d$  value was calculated by using a Kaleida Graph (Synergy software, Reading, PA, USA).

Equation (2);

$$F = F_{\min} + \frac{(F_{\max} - F_{\min})}{2[probe]_0} \left[ ([probe]_0 + [K^+] + K_d) - \{ ([probe]_0 + [K^+] + K_d)^2 - 4[probe]_0[K^+] \}^{1/2} \right] \quad (2)$$

where  $F$ ,  $F_{\max}$ , and  $F_{\min}$  represents the observed, maximum and minimum fluorescence intensity respectively,  $[probe]_0$  represents total concentration of probe (1  $\mu$ M here) and  $[K^+]$  represents concentration of potassium ion.  $K_d$  represents dissociation constant.

**Plasmid construction for HaloTag-His:** HaloTag cDNA was amplified from pFN18A by using the following primers: 5'-GATGGCA GAAATC GGTACT GGCTTT CCATTC GACCCC-3' and 5'-TGCCGG AAATCT CGAGCG TCGACA GCCAGC-3'. C-Histag-pET3a (a kind gift from Dr. Shimonishi, University of Tokyo, Japan) was digested with XhoI, blunt-ended with the Klenow fragment and dephosphorylated with BAP. The purified PCR product was ligated into the blunt-ended C-His-pET3a. The obtained plasmid was checked by sequence analysis.

**Plasmid construction for mCherry-HaloTag fused protein.** Linker (HRPVAT) -Halo cDNA was amplified from pFN18A by using the following primers: 5'-TCATAGA CCTGTA GCAACT ATGGCA GAAATC GGTACT GGCTTT CCATTC GACCCC-3' and 5'-TTCAGCCGG AAATCT CGAGCG TCGACA GCCAGC-3'. N-Histag-pET3a (a kind gift from Dr. Shimonishi, University of Tokyo, Japan) was digested with XhoI, blunt-ended with the Klenow fragment and dephosphorylated with BAP. Purified PCR product was ligated into the blunt-ended N-Histag-pET3a. This plasmid was digested with XhoI, blunt-ended with the Klenow fragment and dephosphorylated with BAP. mCherry-Linker (GGGS) cDNA was amplified from pmCherry-C1 by using the following primers: 5'-TATGGTGAGC AAGGGC GAGGAG GATAAC ATGGCC-3' and 5'-GTGAACCTCCA CCCTTG TACAGC TCGTCC ATGCCG CCGGTG-3'. The purified PCR product was ligated into the blunt-ended Histag-Halo-HRPVAT-pET3a.

Histag-mCherry-Linker-Halo fragment was amplified from the plasmid by using the following primers: 5'-AATACG ACTCAC TATAGG GAGACC ACAACG GTTTCC CTCTAG-3' and 5'-TGCCGG AAATCT CGAGCG TCGACA GCCAGC-3'. C-FLAG-pET3a (a kind gift from Dr. Shimonishi, University of Tokyo, Japan) was digested with XhoI, blunt-ended with the Klenow fragment and digested again with XbaI. The purified PCR product was ligated into the digested N-FLAG-pET3a. The obtained plasmid was checked by sequence analysis.

#### **Expression and purification of Halo-Histag and Histag-Halo-Linker-mCherry-FLAG:**

The constructed Halo-Histag-pET3a and Histag-Halo-Linker-mCherry-FLAG-pET3a plasmids were transformed into *E coli* BL21 (DE3) competent cells. Transformed *E coli* cells were added to LB medium (150 mL) and cultured at 25 °C in a shaking incubator until the turbidity at 600 nm reached 0.5. Then, IPTG (45 µL of 1 M) was added. The cells were cultured at 25 °C for 8 h, harvested by centrifugation (2150 g, 4 °C) for 10 min and resuspended in PBS (0.5 mL). Then, Bugbuster master mix (7.5 mL, Novagen) was added to lyse the cells, and proteins were extracted. After 30 min at 0 °C, the supernatant was loaded onto Ni-NTA agarose gel for purification by metal-ion affinity chromatography through the His-tag. The gel was washed with PBS (20 mM imidazole, 0.04% Tween20), then each Histag-conjugated protein was eluted with PBS (300 mM imidazole, 0.04% Tween20). For Halo-Histag, the buffer was changed to PBS by dialysis to remove excess imidazole. For Histag-Halo-Linker-mCherry-FLAG, the collected fractions were diluted with Tris-HCl buffer (50 mM, pH 7.7, 0.04% Tween20) and successively purified by HiTrap Q HP (GE healthcare). The column was washed with Tris-HCl buffer (50 mM, pH 7.7, 100 mM NaCl, 0.04% Tween20) and the target protein was eluted with Tris-HCl buffer (50 mM, pH 7.7, 350 mM NaCl, 0.04% Tween20). The buffer of collected solution was changed to PBS (K<sup>+</sup> free) by PD-10 desalting column. The obtained protein solution was analyzed by SDS-PAGE (4–20% gradient acrylamide).

**Protein labeling with developed K<sup>+</sup> probe.** (a) Without BSA; To the PBS solution of protein (90-100  $\mu$ M, 40  $\mu$ L) was added each developed K<sup>+</sup> probe (as 1 mM stock solution, 1 eq) and incubated at 37 °C for 1 hour. The reaction mixture was purified by PD-10 desalting column to remove unlabeled K<sup>+</sup> probe. (b) with BSA; To the 40  $\mu$ L of PBS containing recombinant protein (45-50  $\mu$ M) and BSA (90-100  $\mu$ M) was added each developed K<sup>+</sup> probe (as 1 mM stock solution, 1 eq for recombinant protein) and incubated at 37 °C for 1 hour. The reaction mixture was purified by PD-10 desalting column to remove unlabeled K<sup>+</sup> probe.

**SDS-PAGE.** Electrophoresis (4–20% gradient acrylamide) was performed under denaturing conditions in the presence of 2-mercaptoethanol. Protein molecular weight standards (Invitrogen) were used as molecular markers. Proteins were visualized by staining with Coomassie Brilliant Blue R-250 (Cosmobio).

**Determination of protein concentrations.** The concentrations of Halo-Histag and Histag-Halo-mCherry-FLAG were determined by measuring absorbance at 280 nm with NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). The concentration of Histag-Halo-mCherry-FLAG was also determined by measuring absorbance at 586 nm of solution. Absorption coefficient  $\epsilon_{586}=72000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  was used for calculation.

**The plasmid construction for sp-HT-Rhod.** The plasmid was a kind gift from Dr. Nagase (Kazusa DNA Res. Inst. Chiba, Japan).

**The plasmid construction for sp-HT-B2R and sp-HT-CXCR4.**

pFN21A coding HT-B2R or HT-CXCR4 (Kazusa DNA Res. Inst. Chiba, Japan) was digested with BssHII and PmeI. The fragment was purified and ligated into pFN21A coding sp-HT-Rhod which was also digested with BssHII and PmeI.

**Preparation of HEK293 stably expressing HaloTag-AGTR1.** The cell line was a kind gift from Dr. Nagase (Kazusa DNA Res. Inst. Chiba, Japan).

### **Estimation of the amount of sp-HT-Rhod on cellular membrane.**

In this experiment, cell cytosol was obtained by means of a procedure shown below. At approximately 80% confluence, HeLa cell monolayers (cultured in 100 mm dish) were transfected with sp-HT-Rhod plasmid by lipofectamine LTX. After 26 hours incubation, the cells were stained with 1  $\mu$ M Alexa660halo in HBSS at 37 °C for 30 min. The cells were washed twice with HBSS (2 mL). Fluorescence microscopic images of 5 fields were captured by IX-71 to count percentage of transfected cells.

The cells were washed twice with PBS (2 mL), scraped off and suspended in PBS (1.5 mL), then centrifuged for 1 min at 15000 rpm. The supernatant was removed and the cells were gently resuspended in 200  $\mu$ L PBS. The cells were sonicated to fracture the cellular membrane. To the solution was added 100  $\mu$ L of lysis buffer containing 50 mM Tris, 150 mM NaCl and 1% triton, incubated on ice for 1 h and centrifuged for 1 min at 15000 rpm. The fluorescence intensity of the supernatant was measured by F7000 (HITACHI). The amount of sp-HT-Rhod labeled with Alexa660halo was estimated from free Alexa660halo fluorescence in PBS:lysis buffer = 2:1 (v/v) solution..

### **Plasmid construction for sp-HT-BK $\alpha$ .**

HaloTag was amplified from pFN18A by using the following primers: 5'-ATGCTAGCATGGCAGAAATCGGTACTGGCTTTCCATTCGACCCC-3' and 5'-ATAAGCTTCCGCCGGAATCTCGAGCGTCGACAGCCAGC-3'. The fragment was digested with NheI and HindIII. BK $\alpha$ -pcDNA3.1 (a kind gift from Dr. Hisao Yamamura, Nagoya City University, Japan) was digested with NheI and HindIII. Purified PCR product was ligated into the plasmid. This plasmid was digested again with BssHII and PmeI. The digested fragment was ligated into the vector pFN21A coding sp-HT-Rhod which was also digested with BssHII and PmeI. The obtained plasmid was checked by sequence analysis.

**General methods of experiments using living cells.** HeLa cells (RIKEN BioResource Center, Japan), Cos7 (RIKEN BioResource Center, Japan) cells and U2OS cells (RIKEN BioResource Center, Japan) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA), supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) and penicillin (100 units/mL)-streptomycin (100  $\mu$ g/mL) liquid (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) at 37 °C in a humidified incubator

containing 5% CO<sub>2</sub> in air. For fluorescent microscopy, HeLa cells were plated in a 35 mm glass-bottomed dish (MatTek Corporation) and cultured overnight in DMEM. HEK293-HT-AGTR1 were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA), supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA), puromycin (50 µg/mL) and penicillin (100 units/mL)-streptomycin (100 µg/mL) liquid (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) at 37 °C in a humidified incubator containing 5% CO<sub>2</sub> in air. For fluorescent microscopy, HeLa cells were plated in a 35 mm glass-bottomed dish (MatTek Corporation) and cultured overnight in DMEM. HT29 cells (stably expressing luciferase, RIKEN BioResource Center, Japan ) were cultured in McCoy's 5a Medium (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA), supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) and penicillin (100 units/mL)-streptomycin (100 µg/mL) liquid (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) at 37 °C in a humidified incubator containing 5% CO<sub>2</sub> in air.

**Transient transfection of cultured cells.** Transient transfection of cultured cells was done with Lipofectamine LTX (Invitrogen) according to the manufacturer's protocols. Briefly, plasmid coding each protein was mixed with Plus reagent and Lipofectamine LTX in Opti-MEM (Invitrogen) and added to cells at 60-70% confluency in a 35 mm glass bottom dish coated with poly *D*-lysine or fibronectin. Cells were used for imaging at 18-24 hours post-transfection.

**General procedure for confocal microscopic imaging.** Cells seeded on 35 mm glass-bottomed dishes were washed once with 1 mL of medium, then incubated in medium containing each probe and 0, 0.5 or 1% (v/v) DMSO as a cosolvent for 10-30 min at 25 or 37 °C. Fluorescence images were captured using a Leica Application Suite Advanced Fluorescence (LAS-AF) with a TCS SP5 and a 63 x objective lens. Appropriate excitation wavelengths and emission windows were chosen for the acquisition of fluorescence images in sequential scanning mode. Light source was a white-light laser, 405 nm diode laser, Ar laser or HeNe laser.

**General procedure for conventional fluorescence imaging.**

The imaging system comprised an inverted microscope (IX 71; Olympus) and cooled CCD camera (Coolsnap HQ, Olympus). The microscope was equipped with a xenon lamp (AH2RX-T; Olympus), a 40 x objective lens (UplanFL, N. A. 1.30 Oil; Olympus). The used fluorescence mirror units were Cy5-4040C (BP608-648 excitation filter, BA672-712 emission filter, DM660, Opto-line) for Alexa660halo and U-MNIBA3 (BP470-495 excitation filter, BA510-550 emission filter, DM505 Olympus) for TLShalo and TAC-Limedex. The whole system was controlled with Metamorph software (Molecular Devices Inc.).

**Fluorescence imaging of K<sup>+</sup> diffusion.** FemtoJet (Eppendorf) was used as a microinjector. InjectMan (Eppendorf) was used as a manipulator. During experiment, 150 mM KCl aq. was effused every 2.5 seconds from a microinjector needle for 300 msec each with 1500 hPa.

**Fluorescence imaging of K<sup>+</sup> efflux under cover glass.**

HeLa cells transfected with sp-HT-Rhod were washed once with 1 mL of DMEM, loaded with 100  $\mu$ L DMEM containing 2  $\mu$ M TLShalo and 10 nM Alexa660halo. The cells were incubated for 30 min at 25 °C. Dyes were removed and cells were washed once with HBSS. In HBSS, confocal microscopic images were captured by sp5 confocal microscope (Leica). Immediately after addition of ionophore, cover glass was mounted in close contact with the cells.

HT29 cells transfected with sp-HT-Rhod were washed once with 1 mL of HBSS (incuding Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>, invitrogen), loaded with 100  $\mu$ L HBSS (incuding Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>, invitrogen) containing 2  $\mu$ M TLShalo, 10 nM Alexa660halo and 0.03% pluronic F-127. then incubated for 15 min at 25°C. Dyes were removed and cells were washed once with HBSS (no Ca<sup>2+</sup>, no Mg<sup>2+</sup>, invitrogen). In HBSS with or without each inhibitor, confocal microscopic images were captured by sp5 confocal microscope. Immediately after addition of ionomycin, cover glass was mounted in close contact with the cells.

**Procedure for total internal reflection fluorescence (TIRF) imaging.**

*Solutions:* The HEPES-buffered solution had an ionic composition of 137 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 2.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 14 mM glucose, and 10 mM HEPES. High K<sup>+</sup> solution had an ionic composition of 102.9 mM NaCl, 40 mM KCl, 2.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 14 mM glucose, and 10 mM HEPES. The pH of these external solutions was adjusted to 7.4 with 10 N NaOH. The pipette solution for electrophysiological recording contained 140 mM KCl, 4.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2.8 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 5 EGTA and 2 mM Na<sub>2</sub>ATP (pCa 6.0). The pH was adjusted to 7.2 with 1 N KOH.

*Transfection:* HEK293 cells (Health Science Research Resources Bank, Osaka, Japan) were transiently transfected with cDNAs coding sp-HT-Rhod and hBK $\alpha$  (0.5 and 2  $\mu$ g, respectively, for coexpression) using LipofectAmine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, USA). Experiments were preformed 48~72 h after transfection.

*Electrophysiological recording:* Electrophysiological experiments were performed using whole-cell patch-clamp configuration with a CEZ-2400 amplifier (Nihon Kohden, Tokyo, Japan), an analog–digital converter (Digidata 1440A; Molecular Devices-Axon Instruments, Foster City, USA), and pCLAMP software (ver. 10.2; Molecular Devices-Axon Instruments), as described previously<sup>68</sup>. Single HEK293 cells were clamped at -80 mV and depolarized to +100 mV for 10 s. Electrophysiological recordings were performed at room temperature (24 $\pm$ 1 °C).

*TIRF imaging for [K<sup>+</sup>] measurement:* Two-dimensional fluorescence images were obtained by a TIRF imaging system (Nikon, Tokyo, Japan), which consisted of a fluorescent microscope (ECLIPSE TE2000-U; Nikon), an objective lens (CFI Plan Apo TIRF 60x/1.45, oil immersion; Nikon), an EM-CCD camera (C9100-12; Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan), and Aquacosmos software (ver. 2.6; Hamamatsu Photonics), as described previously [ref]. Alexa488halo and TLShalo were excited with a 488-nm argon laser (Coherent, Santa Clara, USA), and the emission was collected using filter cubes (DM495/BA500~545 and DM510/BA520~560, respectively; Nikon). Fluorescent signal is expressed as F/F<sub>0</sub>, where F is the averaged fluorescence intensity in the TIRF area during measurement and F<sub>0</sub> is that before the start of depolarizing stimulus. TIRF images with the resolution of 178 nm per pixel (x-y) and less than 200 nm (z) were scanned every 1.041 s.



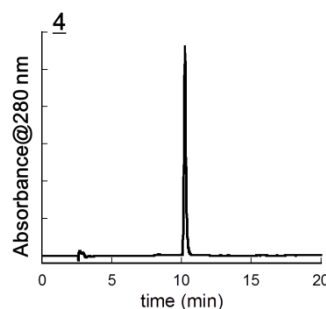
**3D culture with Cellbed®.** 3D culture of HEK stably expressing HaloTag-AGTR1 was performed according to the manufacturer's protocols (Japan Vilene Company, Ltd.).

**Synthesis of compound 1.** Compound 1 was synthesized as previously described in ref<sup>23</sup>.

**Synthesis of compound 2.** Compound 1 (32.7 mg, 47.1  $\mu$ mol) was dissolved in 0.5 mL of glacial acetic acid.  $\text{HNO}_3$  (2.5  $\mu$ L, 39.3  $\mu$ mol, 0.8 eq) and  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (6.2  $\mu$ L, 112  $\mu$ mol, 2.4 eq) were added and heated to 100 °C, until the mixture turned dark yellow. Then stirring was continued for 5 min at ambient temperature. The reaction mixture was poured into 30 mL sat.  $\text{NaHCO}_3$  aq, extracted with dichloromethane, dried over sodium sulfate, filtered and evaporated. The crude compound was purified with column chromatography over NH silica using dichloromethane, yielding compound 2 (15.0 mg, 43%) as yellow oil.  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 2.18 (s, 6H), 3.27-3.32 (m, 4H), 3.41-3.45 (m, 7H), 3.63 (s, 8H), 3.69 (m, 8H), 3.81 (t, 2H,  $J$  = 4.4 Hz), 4.16 (s, 8H), 4.23 (t, 2H,  $J$  = 4.4 Hz), 6.61 (s, 2H), 6.68 (d, 2H,  $J$  = 7.2 Hz), 6.87 (d, 2H,  $J$  = 7.2 Hz), 7.00 (d, 1H,  $J$  = 8.8 Hz), 7.72 (d, 1H,  $J$  = 2.4 Hz), 7.80 (dd, 1H,  $J$  = 8.8 Hz, 2.4 Hz).  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 21.0, 53.2, 53.7, 59.0, 67.1, 68.1, 70.0, 70.7, 71.2, 76.5, 108.5, 114.3, 116.1, 118.9, 121.5, 121.7, 132.8, 138.3, 139.4, 144.8, 148.3, 152.9. HRMS (ESI<sup>+</sup>): calcd 739.3918 for  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; found 739.3882 (-3.6 mmu)

**Synthesis of compound 3.** Compound 2 (15.0 mg, 20.3  $\mu$ mol) was dissolved in 10 mL of dichloromethane containing 10% Pd/C. The reaction mixture was stirred under a hydrogen atmosphere for 17 h. The reaction mixture was filtered and evaporated. The crude compound was purified with column chromatography over NH silica using dichloromethane, yielding compound 15 (7.7 mg, 54%) as colorless oil.  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 2.23 (s, 6H), 3.40-3.77 (m, 33H), 3.96 (t, 4H,  $J$  = 6.0 Hz), 4.14 (t, 2H,  $J$  = 4.8 Hz), 6.21 (dd, 1H,  $J$  = 8.4 Hz, 2.4 Hz), 6.32 (d, 1H,  $J$  = 2.4 Hz), 6.56 (s, 2H), 6.63 (d, 2H,  $J$  = 8.0 Hz), 6.86 (d, 2H,  $J$  = 8.0 Hz), 6.96 (d, 2H,  $J$  = 8.4 Hz).  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 21.1, 53.6, 53.9, 59.1, 67.3, 67.7, 70.0, 71.1, 71.2, 102.2, 107.8, 114.0, 120.8, 121.3, 125.1, 129.7, 132.6, 138.1, 143.1, 153.3, 154.5. HRMS (ESI<sup>+</sup>): calcd 709.4176 for  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; found 709.4180 (0.4 mmu)

**Synthesis of compound 4.** Compound **3** (4.1 mg, 9.2  $\mu\text{mol}$ ) and 2',7'-dichloro-5-carboxyfluorescein<sup>69</sup> (6.2 mg, 8.8  $\mu\text{mol}$ ) was dissolved in 100  $\mu\text{L}$  of anhydrous DMF. N,N-diisopropylethyl amine (DIEA) (3.2  $\mu\text{L}$ , 18.3  $\mu\text{mol}$ , 2.1 eq) and 2-(1*H*-7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetra-methyl uronium hexafluorophosphate methanaminium (HATU) (3.8 mg, 10.1  $\mu\text{mol}$ , 1.2 eq) were added, stirred at ambient temperature under argon atmosphere for 5 h. The reaction mixture was purified by means of semi-preparative HPLC under the following conditions: A/B = 50/50-0/100 (30 min). (solvent A: H<sub>2</sub>O with 0.1% TFA, solvent B: acetonitrile/H<sub>2</sub>O = 80/20 with 0.1% TFA). The fractions containing the desired product were collected, evaporated and lyophilized to afford compound **17** (1.4 mg, 14%) as red solid. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN)  $\delta$ : 2.36 (s, 6H), 3.38 (s, 3H), 3.41 (m, 2H), 3.62 (s, 8H), 3.69-3.76 (m, 8H), 3.85-3.88 (m, 8H), 3.95 (t, 4H,  $J = 7.2$  Hz), 4.13 (t, 4H,  $J = 7.2$  Hz), 4.20 (m, 2H), 6.79 (s, 2H), 6.94 (s, 2H), 7.01 (s, 2H), 7.03 (s, 1H), 7.21 (d, 1H,  $J = 9.0$  Hz), 7.32-7.43 (m, 4H), 7.48 (s, 1H), 8.28 (dd, 1H,  $J = 8.1$  Hz, 1.5 Hz), 8.51 (s, 1H), 8.94 (s, 1H). HRMS (ESI<sup>+</sup>): calcd 1135.3874 for [M+H]<sup>+</sup>; found 1135.3828 (-4.6 mmu). HPLC analysis was performed by monitoring absorbance at 280 nm, using linear gradient 60/40-0/100 (15 min), solvent A: H<sub>2</sub>O with 0.1% TFA, solvent B: acetonitrile/H<sub>2</sub>O = 80/20 with 0.1% TFA. Rt was 10.2 min. Purity of the compound was confirmed by HPLC.



**Synthesis of compound 5.** Compound **5** was synthesized as previously described in ref.<sup>23</sup> A solution of 134 mg (0.193 mmol) of **1** in 1.4 ml DMF was cooled to  $-5 - 0$  °C. 610 mg (3.98 mmol, 20 eq) POCl<sub>3</sub> was added, while the temperature was kept below 0 °C. The ice bath was removed when the addition was complete. The solution was stirred at ambient temperature for 18 h, then warmed to 70 °C for 1 h, and poured into 40 mL of icy water, neutralized with sat. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> aq to pH 7. The aqueous solution was extracted 3  $\times$  30 mL dichloromethane, dried over sodium sulfate and evaporated, resulting **5** (143 mg, quant. ) as light yellow oil. This oil, may still contain small amount of DMF, was used directly for next step reaction without further purification.

**Synthesis of compound 6.** Compound 6 and 7 was synthesized as previously described in ref<sup>23</sup>. (a) Methyl 5-(benzyloxycarbonyl)-2,4-dimethyl-3-pyrrolepropionate (250 mg, 0.793 mmol) was dissolved in 50 mL of acetone containing 10% Pd/C. The reaction mixture was stirred under a hydrogen atmosphere for 12 h. The reaction mixture was filtered and evaporated. The residue was then dissolved in TFA (2 mL) under argon and stirred at ambient temperature for 15 min. The reaction mixture was diluted with dichloromethane. The solution was washed with water and 1 M NaHCO<sub>3</sub> aq, dried over sodium sulfate, filtered and evaporated, resulting in methyl-3-(2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-yl)-propanoate (106 mg, 74%) as a brown oil. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 2.03 (s, 3H), 2.18 (s, 3H), 2.45 (m, 2H), 2.72 (m, 2H), 3.67 (s, 3H), 6.38 (s, 1H), 7.51 (br, 1H). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 10.3, 11.2, 19.9, 35.1, 51.4, 113.0, 116.7, 117.9, 124.3, 173.9. LRMS (ESI<sup>+</sup>): 182 [M+H]<sup>+</sup>.

(b) Compound 1 (143 mg, 0.193 mmol) and methyl-3-(2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-yl)-propanoate (72.8 mg, 0.402 mmol, 2.1 eq) were dissolved in 36 mL of anhydrous dichloromethane in an argon atmosphere. Trifluoroacetic acid (0.08 mL) was added and the solution was stirred at room temperature for 20 hr. *p*-chloranil (47.9 mg, 0.195 mmol, 1 eq) was then added and stirred for 15 min. The reaction mixture was washed with water, dried over sodium sulfate, and evaporated. The residue was purified by column chromatography over neutral aluminum oxide using dichloromethane/methanol/triethylamine = 100:0:1 – 100:2:1, yielding brown solid. The solid was dissolved in anhydrous toluene (15 mL) under argon atmosphere. *N,N*-diisopropylethylamine (0.50 mL, 2.87 mmol) was added and the reaction mixture was stirred for 10 min. BF<sub>3</sub>·etherate (0.5 mL, 3.98 mmol) was added and stirring was continued for 30 min. The reaction mixture was diluted with dichloromethane and washed with water. The dichloromethane extract was dried over sodium sulfate and evaporated. The crude product was purified by repeated column chromatography over NH silica using dichloromethane, yielding compound 6 (37.6 mg, 18%) as red solid. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.34 (s, 6H), 2.25 (s, 6H), 2.34 (t, 4H, *J* = 5.9 Hz), 2.53 (s, 6H), 2.62 (t, 4H, *J* = 5.9 Hz), 3.30 - 3.46 (m, 11H), 3.61 - 3.80 (m, 24H), 4.03 - 4.13 (m, 10H), 6.56 (s, 2H), 6.66 (d, 2H, *J* = 5.9 Hz), 6.71 (d, 1H, *J* = 5.9 Hz), 6.75 (s, 2H), 6.87 (d, 2H, *J* = 5.9 Hz), 7.27 (m, 1H). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 11.8, 12.6, 19.3, 21.1, 34.2,

51.7, 52.8, 53.8, 59.2, 66.7, 68.1, 70.0, 71.1, 71.2, 113.3, 113.7, 121.0, 121.3, 121.3, 121.8, 128.6, 129.0, 131.1, 132.5, 138.1, 138.8, 139.3, 140.9, 152.4, 153.1, 153.8, 173.1. HRMS (ESI<sup>+</sup>): calcd for [M+Na]<sup>+</sup>, 1134.5762; found 1134.5712 (4.6 mmu).

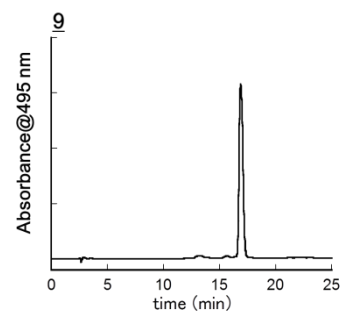
**Synthesis of compound 7 (TAC-Lime).** Compound **6** (37.6 mg, 33.8  $\mu$ mol) was dissolved in the mixture of 1.2 mL dichloromethane, 8 mL methanol and 2 mL of 1 N NaOH aq. The solution was stirred at ambient temperature for 4.5 h. The solution was diluted with water, washed with dichloromethane. Then the aqueous solution was acidified with 1N HCl aq and repeatedly extracted with dichloromethane until the aqueous layer turned colorless. The combined dichloromethane extract was dried over magnesium sulfate and purified by preparative TLC over silica 60 using dichloromethane/methanol = 5:1 to afford compound **5** (31.5 mg, 86%) as red solid. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 1.32 (s, 6H), 2.16 (t, 4H,  $J$  = 8.3 Hz), 2.29 (s, 6H), 2.48 (s, 6H), 2.59 (t, 4H,  $J$  = 8.3 Hz), 3.30 - 3.72 (m, 31H), 4.12 (s, 2H), 4.58 (s, 4H), 4.90 (m, 2H), 6.65 (d, 1H,  $J$  = 7.8 Hz), 6.83 - 6.85 (m, 5H), 7.04 (d, 1H,  $J$  = 7.8 Hz), 7.26 (d, 2H,  $J$  = 8.3 Hz). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 12.2, 12.7, 39.1, 53.1, 54.5, 59.1, 67.9, 69.0, 69.4, 69.9, 72.1, 114.2, 114.5, 121.8, 123.4, 125.9, 130.3, 131.9, 132.2, 137.0, 138.3, 140.2, 142.0, 142.6, 154.0, 154.7, 155.0, 181.1. HRMS (ESI<sup>+</sup>): calcd for [M+H]<sup>+</sup>, 1084.5630; found 1084.5582 (-4.8 mmu)

**Synthesis of compound 8.** Compound **5** (35.9 mg, 0.050 mmol) and 2-(benzyloxy)-2-oxoethyl 2,4-dimethyl-2*H*-pyrrole-3-carboxylate (29.5 mg, 0.103 mmol, 2 eq) were dissolved in 8 mL of anhydrous dichloromethane in an argon atmosphere. Trifluoroacetic acid (0.1 mL) was added and the solution was stirred at room temperature for 19 hr. 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ) (11.3 mg, 0.050 mmol, 1 eq) was then added and stirred for 30 min. The reaction mixture was washed with water, dried over sodium sulfate, and evaporated. The residue was purified by column chromatography over neutral aluminum oxide using dichloromethane/methanol = 100:0-100:2-100:3, yielding brown solid. The solid was dissolved in anhydrous dichloromethane (10 mL) under argon atmosphere. *N,N*-diisopropylethylamine (0.10 mL, 0.57 mmol) and BF<sub>3</sub>·etherate (0.15 mL, 1.20 mmol) was added and stirring continued for 1.5 h. The reaction mixture was diluted with dichloromethane and washed

with water. The dichloromethane extract was dried over sodium sulfate and evaporated. The crude product was purified by column chromatography over NH silica using dichloromethane, yielding compound **6** (20.2 mg, 31%) as brown solid.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.76 (s, 6H), 2.24 (s, 6H), 2.84 (s, 6H), 3.30-3.34 (m, 4H), 3.41-3.45 (m, 5H), 3.64 (s, 8H), 3.70-3.74 (m, 8H), 3.77-3.80 (m, 4H), 4.01-4.15 (m, 10H), 4.80 (s, 4H), 5.20 (s, 4H), 6.57 (s, 2H), 6.65 (d, 2H,  $J = 11$  Hz), 6.70-6.73 (m, 2H), 6.86 (d, 2H,  $J = 11$  Hz), 7.35-7.38 (m, 11H).  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 13.8, 15.0, 21.1, 52.7, 53.8, 59.1, 60.4, 66.7, 67.2, 68.2, 70.0, 71.0, 71.2, 112.9, 113.8, 121.1, 121.1, 121.4, 121.7, 126.7, 127.0, 128.4, 128.6, 128.7, 131.9, 132.6, 135.0, 138.2, 139.9, 146.6, 148.5, 152.5, 153.1, 159.8, 163.4, 167.7. HRMS (ESI $^+$ ): calcd 1324.6052 for  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; found 1324.6041 (-1.1 mmu)

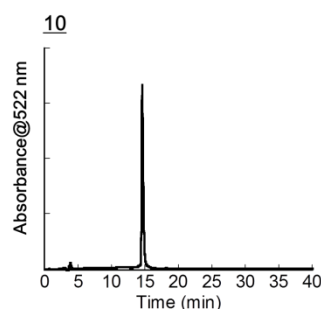
**Synthesis of compound **9** (TBEs).** Compound **8** (7.9 mg, 5.97  $\mu\text{mol}$ ) was dissolved in 2 mL of methanol. NaOH (287 mg, 7.18 mmol) in 2 mL of methanol was added slowly at 0  $^\circ\text{C}$ , and the solution was stirred for 1.5 h. The solution was acidified with 2 N HCl aq and extracted with dichloromethane. The organic layer was washed with brine twice, dried over sodium sulfate, filtered, and evaporated. The crude product was purified by means of semi-preparative HPLC under the following conditions: A/B = 60/40-0/100 (20 min). (solvent A:  $\text{H}_2\text{O}$  with 0.1 M triethylammonium acetate (TEAA), solvent B; acetonitrile/ $\text{H}_2\text{O}$  (with 0.1 M TEAA) = 80/20). The fractions containing the desired product were collected, desalted with sep-pak (GE healthcare) and lyophilized to afford compound **9** (2.7 mg, 40%) as brown solid.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 1.77 (s, 6H), 2.27 (s, 6H), 2.80 (s, 6H), 3.40 (s, 3H), 3.3 (6H, masked by MeOH), 3.54-3.75 (m, 20H), 4.01-4.19 (m, 10H), 4.62 (s, 4H), 6.71-6.80 (m, 5H), 6.99 (m, 3H), 7.38 (s, 1H). HRMS (ESI $^+$ ): calcd 1144.5113 for  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; found 1144.5068 (-4.5 mmu). HPLC analysis was performed by monitoring absorbance at 495 nm, using linear gradient 60/40-0/100 (20 min), solvent A:  $\text{H}_2\text{O}$  with 0.1 M triethylammonium acetate (TEAA), solvent B; acetonitrile/ $\text{H}_2\text{O}$  (with 0.1 M TEAA) = 80/20. Rt was 16.9 min.



### Synthesis of compound **10**.

TAC-Lime (2.6 mg, 2.40  $\mu\text{mol}$ ) was dissolved in 760  $\mu\text{L}$  of anhydrous DMF. DMT-MM (336  $\mu\text{L}$  of 10 mM DMF solution, 3.36  $\mu\text{mol}$ , 1.4 eq) was added, purged by Ar and stirred at ambient temperature for 2 h (Solution A). L- $\alpha$ -phosphatidylethanolamine, dipalmitoyl (1.6 mg, 2.31  $\mu\text{mol}$ , 1 eq) and *N,N*-diisopropylethyl amine (DIEA) (0.74  $\mu\text{L}$ , 2.84  $\mu\text{mol}$ , 1.2 eq) were dissolved in 1 mL of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH = 1:1 solvent. The solution were added to solution A, stirred at ambient temperature for 2 h. The reaction mixture was dissolved in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , washed with 0.1 M triethylammonium acetate (TEAA) buffer and evaporated. The residue was purified by column chromatography over silica gel using dichloromethane/methanol = 100:0-55:45 to afford compound **10** (0.64 mg, 15%) as red solid. HRMS (ESI<sup>-</sup>): calcd 1756.0520 for  $[\text{M}-\text{H}]^-$ ; found 1756.0515 (-0.5 mmu) HPLC analysis was performed by monitoring absorbance at 522 nm, using linear gradient 60/40-0/100 (20 min), solvent A: acetonitrile/ $\text{H}_2\text{O}$  (with 0.1 M TEAA) = 80/20, solvent B: methanol. Rt was 14.6 min.



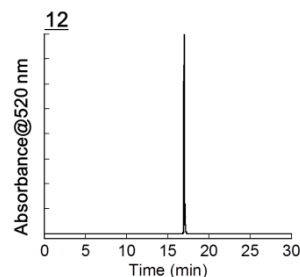
**Synthesis of compound **11**.** TAC-Lime (0.89 mg, 0.82  $\mu\text{mol}$ ) was dissolved in 0.3 mL of anhydrous DMF. N-hydroxy succinimide (NHS) (12.3  $\mu\text{L}$  of 100 mM DMF solution, 1.23  $\mu\text{mol}$ , 1.5 eq), WSCD (12.3  $\mu\text{L}$  of 100 mM DMF solution, 1.23  $\mu\text{mol}$ , 1.5 eq) and *N,N*-diisopropylethyl amine (DIEA) (16.4  $\mu\text{L}$  of 1 M DMF solution, 1.64  $\mu\text{mol}$ , 2 eq) were added, stirred at ambient temperature for 17 h. For complete consumption of TAC-Lime, NHS (0.89  $\mu\text{mol}$ , 1 eq), WSCD (0.89  $\mu\text{mol}$ , 1 eq) and DIEA (1.19  $\mu\text{mol}$ , 1.3 eq) were added and stirred for another 19 h. The reaction mixture was purified by means of semi-preparative HPLC under the following conditions: A/B = 50/50-0/100 (20 min). (solvent A:  $\text{H}_2\text{O}$  with 0.1% TFA, solvent B: acetonitrile/ $\text{H}_2\text{O}$  = 80/20 with 0.1% TFA). The fractions containing the desired product were collected and lyophilized to afford compound **11** (200 nmol, 24%) as a red solid. HRMS (ESI<sup>+</sup>): calcd 1181.5794 for  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; found 1181.5777 (-1.6 mmu)

**Synthesis of Av-TAC-Lime.** To the 0.1 N  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  aq. solution of avidin (36.5  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{L}$ ) was added compound **11** (as 1 mM DMSO solution, 3 eq) and incubated at 25  $^\circ\text{C}$  for

1 hour. The reaction mixture was purified by PD-10 desalting column to remove unlabeled compound **11**.

#### Synthesis of compound **12** (TLHalo).

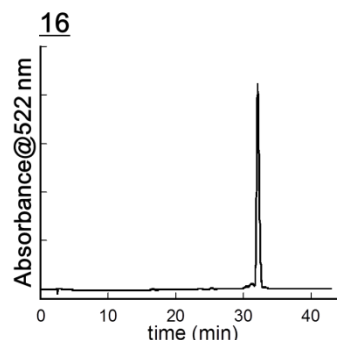
TAC-Lime (9.3 mg, 8.59  $\mu\text{mol}$ ) was dissolved in 3.7 mL of anhydrous DMF. DMT-MM (1.29 mL of 10 mM DMF solution, 12.9  $\mu\text{mol}$ , 1.5 eq) and *N,N*-diisopropylethyl amine (DIEA) (4.3  $\mu\text{L}$ , 25.8  $\mu\text{mol}$ , 3 eq) was added, purged by Ar and stirred at ambient temperature for 3 h. *N,N*-diisopropylethyl amine (DIEA) (2.2  $\mu\text{L}$ , 13.2  $\mu\text{mol}$ , 1.5 eq) and HaloTag® Amine (O2) Ligand (9.14  $\mu\text{mol}$ , 1.1 eq) were added to the reaction mixture, purged by Ar and stirred at ambient temperature for 15 h. The reaction mixture was purified by means of semi-preparative HPLC under the following conditions: A/B = 80/20-0/100 (15 min). (solvent A:  $\text{H}_2\text{O}$  with 0.1 M triethylammonium acetate (TEAA), solvent B; acetonitrile/ $\text{H}_2\text{O}$  (with 0.1 M TEAA) = 80/20). The fractions containing the desired product were collected, desalted with sep-pak (GE healthcare) and lyophilized to afford compound **12** (2.13 mg, 1.65  $\mu\text{mol}$ , 19%) as red solid, triethylamine salt.  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$ : 1.26-1.39 (m, 19H), 1.53 (t,  $J = 7.0$  Hz), 1.71 (t,  $J = 7.3$  Hz), 2.28-2.64 (m, 20H), 3.08-3.17 (m, 6H), 3.37-3.73 (m, 35H), 3.90-4.14 (m, 16H), 6.58 (br, 1H), 6.79-6.88 (m, 4H), 7.01 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 7.27 (d, 1H,  $J = 7.3$  Hz), 7.33 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz). HRMS (ESI<sup>+</sup>): calcd 1289.6863 for  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; found 1289.6820 (-4.3 mmu). HPLC analysis was performed by monitoring absorbance at 520 nm, using linear gradient 80/20-0/100 (10 min), solvent A:  $\text{H}_2\text{O}$  with 0.1% TFA, solvent B; acetonitrile/ $\text{H}_2\text{O}$  = 80/20 with 0.1% TFA. Rt was 17.2 min.



**Synthesis of compound **13**.** Compound **13-15** were synthesized according to ref <sup>70</sup>.

**Synthesis of compound **16** (TLPEGHalo).** TAC-Lime (5.6 mg, 5.2  $\mu\text{mol}$ ) was dissolved in 0.8 mL of anhydrous DMF. *N,N*-diisopropylethyl amine (DIEA) (5.2  $\mu\text{L}$  of 1 M DMF solution, 5.2  $\mu\text{mol}$ , 1 eq) and *O*-(*N*-succinimidyl) *N,N,N',N'*-tetramethyluronium tetrafluoroborate (TSTU) (1.9 mg, 6.3  $\mu\text{mol}$ , 1.2 eq) were added, stirred at ambient

temperature for 15 h. Then to the reaction mixture were added compound **15** (2.2 mg, 5.2  $\mu\text{mol}$ , 1 eq) and DIEA (62 mL of 100 mM DMF solution, 6.2  $\mu\text{mol}$ , 1.2 eq) and stirred at ambient temperature for 18 h. For complete consumption of TAC-Lime monoSE, compound **15** (3.7  $\mu\text{mol}$ , 0.7 eq) and DIEA (3.7  $\mu\text{mol}$ , 0.7 eq) were added and stirred for another 2.5 h. The reaction mixture was purified by means of semi-preparative HPLC under the following conditions: A/B = 50/50-0/100 (30 min). (solvent A:  $\text{H}_2\text{O}$  with 0.1 M triethylammonium acetate (TEAA), solvent B; acetonitrile/ $\text{H}_2\text{O}$  (with 0.1 M TEAA) = 80/20). The fractions containing the desired product were collected, desalted with sep-pak (GE healthcare) and lyophilized to afford compound **16** (1.4 mg, 18%) as red solid.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.21 (m, 2H), 1.25 (s, 2H), 1.31 (m, 2H), 1.36 (m, 6H), 1.44 (m, 2H), 1.57 (m, 2H), 1.75 (m, 2H), 2.18 - 2.26 (m, 7H), 2.39 (m, 2H), 2.50 (s, 3H), 2.53 (s, 3H), 2.62 - 2.67 (m, 4H), 2.92 - 2.97 (m, 2H), 3.28 - 3.32 (m, 4H), 3.40 - 3.72 (m, 41H), 3.91 (s, 2H), 4.03 (m, 8H), 4.12 - 4.13 (m, 2H), 6.14 (br, 1H), 6.57 - 6.88 (m, 9H). HRMS (ESI<sup>+</sup>): calcd for  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 1434.7602; found 1434.7573 (-2.9 mmu). HPLC analysis was performed by monitoring absorbance at 522 nm, using linear gradient 50/50-0/100 (30 min), solvent A:  $\text{H}_2\text{O}$  with 0.1 M triethylammonium acetate (TEAA), solvent B; acetonitrile/ $\text{H}_2\text{O}$  (with 0.1 M TEAA) = 80/20. Rt was 32.1 min.



**Synthesis of compound 17-19.** Compound **17-19** were synthesized according to ref<sup>71</sup>.

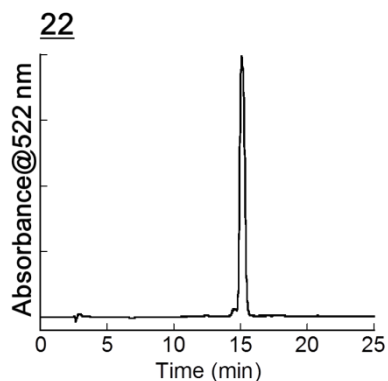
**Synthesis of compound 20.** A mixture of **19** (34.8 mg, 64.1  $\mu\text{mol}$ ), *N,N*-diisopropylethyl amine (DIEA) (40 mL, 230  $\mu\text{mol}$ , 3.6 eq) and *O*-(*N*-succinimidyl) *N,N,N',N'*-tetramethyluronium tetrafluoroborate (TSTU) (40.6 mg, 135  $\mu\text{mol}$ , 2 eq) in 0.75 mL anhydrous DMF was stirred at ambient temperature for 7 hours. Then a mixture of HaloTag® Amine (O2) Ligand (40.3 mg, 180  $\mu\text{mol}$ , 2.8 eq) and DIEA (80  $\mu\text{L}$ , 430  $\mu\text{mol}$ , 7.2 eq) in 1.25 mL anhydrous DMF was added and stirred at ambient temperature for 24 hours. The reaction mixture was diluted with  $\text{H}_2\text{O}$  (0.1% TFA) and purified by means of semi-preparative HPLC under the following conditions: A/B = 80/20-0/100 (30 min)



(solvent A: H<sub>2</sub>O with 0.1% TFA, solvent B; acetonitrile/H<sub>2</sub>O= 80/20 with 0.1% TFA). The fractions containing the desired product were collected, evaporated and lyophilized to afford compound **20** (9.7 mg, 20%, mixture of two diastereomers) as white amorphous solid. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO) δ: 1.30-1.38 (m, 4H), 1.47-1.51 (m, 2H), 1.66-1.73 (m, 2H), 2.93-3.64 (m, 18H), 4.20 (s, 1H), 5.05 (br, 4H), 7.33-7.89 (m, 8H). <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, DMSO) δ: 24.9, 26.1, 29.0, 32.0, 45.4, 46.6, 64.4, 65.7, 66.7, 68.9, 69.3, 69.4, 69.6, 69.7, 70.2, 70.2, 120.0, 125.4, 127.1, 127.6, 140.6, 143.8, 143.9, 155.7, 166.6. HRMS (ESI): calcd 746.1820 for [M-H]<sup>-</sup>; found 746.1825 (0.5 mmu)

**Synthesis of compound 21.** Compound **20** (9.7 mg, 13.0 μmol) was dissolved in 0.5 mL DMF containing 20% piperidine and stirred at ambient temperature for 30 min. The reaction mixture was diluted with H<sub>2</sub>O (0.1% TFA) and purified by means of semi-preparative HPLC under the following conditions: A/B = 90/10-0/100 (20 min) (solvent A: H<sub>2</sub>O with 0.1% TFA, solvent B; acetonitrile/H<sub>2</sub>O= 80/20 with 0.1% TFA). The fractions containing the desired product were collected, evaporated and lyophilized to afford compound **21** (1.0 mg, 14%, mixture of two diastereomers) as white amorphous solid. HRMS (ESI): calcd 524.1139 for [M-H]<sup>-</sup>; found 524.1104 (-3.5 mmu)

**Synthesis of compound 22 (TLShalo).** TAC-Lime (2.1 mg, 2.0 μmol, 1.2 eq) and compound **21** (0.9 mg, 1.6 μmol, 1 eq) was dissolved in 1 mL of anhydrous DMF containing 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride *n*-hydrate (DMT-MM) (10 μmol, 6 eq) and *N,N*-diisopropylethyl amine (DIEA) (2.6 μL, 15.0 μmol, 9 eq). The solution was stirred at ambient temperature for 4 h. Then to the reaction mixture was added 1 mL of 0.2 N Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> aq and stirred for 30 min. Resulting mixture was repeatedly purified by means of semi-preparative HPLC under the following conditions: A/B = 80/20-0/100 (30 min), followed by 60/40-0/100 (15 min). (solvent A: H<sub>2</sub>O with 0.1 M triethylammonium acetate (TEAA), solvent B; acetonitrile/H<sub>2</sub>O (with 0.1 M TEAA) = 80/20). The fractions containing the desired product were



collected, desalted with sep-pak (GE healthcare) and lyophilized to afford compound **22** (**TLSHalo**) (1.3 mg, 41%) as red solid. HRMS (ESI): calcd 1589.6585 for  $[M-H]^-$ ; found 1589.6569 (-1.6 mmu). HPLC analysis was performed by monitoring absorbance at 522 nm, using linear gradient 60/40-0/100 (15 min), solvent A: H<sub>2</sub>O with 0.1 M triethylammonium acetate (TEAA), solvent B; acetonitrile/H<sub>2</sub>O (with 0.1 M TEAA) = 80/20. Rt was 15.1 min.

**Synthesis of compound 23.** Compound **22** (100  $\mu$ L of 1 mM DMSO solution, 100 nmol) was added to 400  $\mu$ L of borate buffer (100 mM, pH 7.8) containing 200  $\mu$ mol (2 eq) of dextran-amino (MW. 10000, life technologies) and 1 mmol (100 eq) of 4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride *n*-hydrate (DMT-MM). The resulting mixture was stirred at ambient temperature for 20 hours. The mixture was purified by PD-10 desalting column using distilled water, lyophilized to afford compound **23** (Dx-TLSHalo) as a red powder.

**Synthesis of compound 24-28.** Compound **24-28** were synthesized according to ref<sup>62</sup>.

**Synthesis of compound 29** Compound **28** (207 mg, 1.12 mmol), 1,8-bis(dimethylamino)naphthalene (289 mg, 1.35 mmol, 1.2 eq) and tert-butyl 3-bromopropanoate (1.18 g, 5.63 mmol, 5 eq) were refluxed in acetonitrile (8 mL) under Ar for 18 h. Then the reaction mixture was cooled to room temperature, diluted with dichloromethane and washed with 0.1 N HCl aq. The organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and evaporated. The residue was purified by column chromatography on silica gel using hexane:ethyl acetate = 2:1 as the eluent to afford compound **29** (115.2 mg, 33%). <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ = 1.44 (s, 1H), 2.56 (t, *J*= 7.2 Hz, 2H), 3.10 (s, 3H), 3.79 (t, *J*= 7.2 Hz, 2H), 6.88 (d, *J*= 3.0 Hz, 1H), 7.18 (dd, *J*= 8.7 Hz, 3.0 Hz, 1H), 7.65 (d, *J*= 8.7 Hz, 1H), 7.81-7.84 (m, 2H), 8.14 (s, 1H), 10.00 (s, 1H) <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ = 28.0, 33.3, 38.4, 48.4, 81.0, 105.6, 116.1, 123.5, 125.1, 126.8, 130.7, 130.9, 134.7, 138.6, 149.0, 171.2, 191.8 HRMS (ESI<sup>+</sup>): calcd 314.1756 for  $[M+H]^+$ ; found 314.1794 (3.8 mmu)

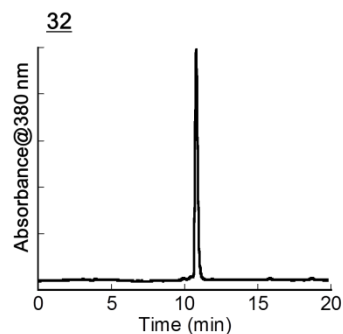
**Synthesis of compound 30** Compound 29 (112 mg, 368  $\mu\text{mol}$ ), compound 25 (158 mg, 442  $\mu\text{mol}$ , 1.2 eq) and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (37.1 mg, 184  $\mu\text{mol}$ , 0.5 eq) were dissolved in DMF (2 mL) and stirred at 90 °C under Ar for 19 h. Then 30 mL icy water was added to the reaction mixture. The resulting precipitate was filtered and purified by column chromatography on silica gel using  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :methanol = 100:1 as the eluent to afford compound 30 (94.3 mg, 55%).

$^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ = 1.38 (s, 1H), (2.5, 2H, hindered by  $\text{DMSO}-d_6$  solvent peak), 3.04 (s, 3H), 3.76 (t,  $J$ = 6.6 Hz, 2H), 7.00 (s, 1H), 7.32 (dd,  $J$ = 9.0 Hz, 1.8 Hz, 1H), 7.80 (d,  $J$ = 9.0 Hz, 1H), 7.97-8.08 (m, 4H), 8.52 (s, 1H), 8.75 (s, 1H)

$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{DMSO}$ )  $\delta$ = 27.6, 32.8, 37.9, 47.6, 79.9, 100.1, 105.1, 115.6, 116.7, 121.9, 124.1, 125.2, 125.5, 126.7, 127.4, 127.6, 130.1, 134.2, 136.5, 148.1, 156.4, 166.8, 170.9, 171.3 HRMS (ESI<sup>+</sup>): calcd 359.0136 for  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; found 359.0099 (-3.7 mmu)

**Synthesis of compound 31** Compound 30 (8.24 mg, 11.6  $\mu\text{mol}$ ) and compound 3 (5.34 mg, 11.6  $\mu\text{mol}$ , 1 eq) were dissolved in 600  $\mu\text{L}$  of anhydrous DMF. HATU (5.55 mg, 14.6  $\mu\text{mol}$ , 1.3 eq) and DIEA (2.6  $\mu\text{L}$ , 15.1  $\mu\text{mol}$ , 1.3 eq) were added, stirred at ambient temperature under argon atmosphere for 21 h. Then the reaction mixture was diluted with dichloromethane and washed with water. The organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and evaporated. The residue was roughly purified by column chromatography on silica gel using  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :methanol = 100:0-100:4 as the eluent to afford compound 31. The compound was used directly for next reaction without further purification. HRMS (ESI<sup>+</sup>): calcd 1153.5684 for  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; found 1153.5670 (-1.4 mmu)

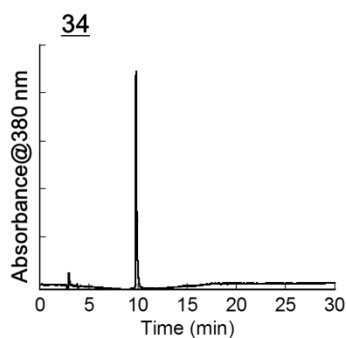
**Synthesis of compound 32** Compound 31 (5.1 mg, 4.41  $\mu\text{mol}$ ) was dissolved in 1.5 mL of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . 500  $\mu\text{L}$  of TFA was added and stirred at ambient temperature for 1.5 h. The reaction mixture was evaporated and purified by means of semi-preparative HPLC under the following conditions: A/B = 80/20-0/100 (10 min). (solvent A:  $\text{H}_2\text{O}$  with 0.1% TFA, solvent B; acetonitrile/ $\text{H}_2\text{O}$ = 80/20 with 0.1% TFA). The fractions containing the desired product were collected and lyophilized to afford compound 32 (2.6 mg, 21% in two steps.) as



yellow solid. HRMS (ESI<sup>+</sup>): calcd 1097.5058 for [M+H]<sup>+</sup>; found 1097.5087 (2.9 mmu). HPLC analysis was performed by monitoring absorbance at 380 nm, using linear gradient 80/20-0/100 (10 min), (solvent A: H<sub>2</sub>O with 0.1% TFA, solvent B; acetonitrile/H<sub>2</sub>O= 80/20 with 0.1% TFA). Rt was 10.8 min.

**Synthesis of compound 33** Compound 32 (2.61 mg, 2.38  $\mu$ mol) was dissolved in 0.5 mL of anhydrous DMF. *N*-hydroxy succinimide (NHS) (1.76 mg, 15.4  $\mu$ mol, 6.5 eq), DCC (1.42 mg, 6.89  $\mu$ mol, 2.9 eq) and *N,N*-diisopropylethyl amine (DIEA) (2.7  $\mu$ L, 15.4  $\mu$ mol, 6.5 eq) were added, stirred at 30 °C for 24 h. After complete consumption of compound 32 was checked with HPLC and mass spectroscopy, the reaction mixture was used to next reaction without further purification. HRMS (ESI<sup>+</sup>): calcd 1194.5222 for [M+H]<sup>+</sup>; found 1194.5218 (-0.4 mmu)

**Synthesis of compound 34** The tripeptide was prepared with an SyroI peptide synthesizer (Biotage) by using the standard Fmoc solid-phase peptide synthesis protocol. Briefly, chlorotrityl resin (30 mg, 39  $\mu$ mol) was placed in a reaction vessel. Subsequently, Fmoc-protected amino acids were sequentially coupled to the resin-bound amino acid from the carboxyl to amino terminus. HATU and DIEA were used for each coupling, and DMF was used as the solvent. For deprotection steps piperidine (40%) in DMF was used. Before peptide cleavage, compound 33 (2.38  $\mu$ mol) and DIEA (4  $\mu$ L, 23.8  $\mu$ mol, 10 eq) dissolved in 400  $\mu$ L DMF was added and shaken at 25 °C for 11 h, then the resin was washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and DMF. Peptide cleavage from the resin was accomplished by shaking with TFA/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:99 v/v) for 20 min and DMF elution. The reaction mixture was evaporated and purified by means of semi-preparative HPLC under the following conditions: A/B = 80/20-0/100 (15 min). (solvent A: H<sub>2</sub>O with 0.1% TFA, solvent B; acetonitrile/H<sub>2</sub>O= 80/20 with 0.1% TFA). The fractions containing the desired product were collected and lyophilized to afford compound 34 (0.5 mg, 14% in two steps.) HRMS (ESI<sup>-</sup>): calcd 1454.4995 for [M-H]<sup>-</sup>; found 1454.4937 (-5.8 mmu). HPLC analysis was performed by monitoring



absorbance at 380 nm, using linear gradient 80/20-0/100 (10 min), (solvent A: H<sub>2</sub>O with 0.1% TFA, solvent B; acetonitrile/H<sub>2</sub>O= 80/20 with 0.1% TFA). Rt was 9.9 min.

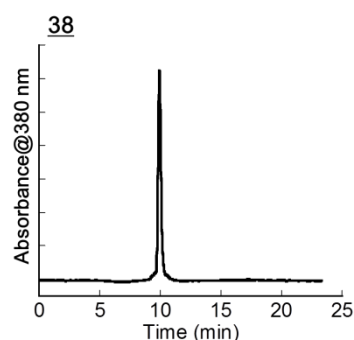
**Synthesis of compound 35** Compound 34 (100  $\mu$ L of 1 mM DMSO solution, 100 nmol) was added to 400  $\mu$ L of borate buffer (100 mM, pH 7.8) containing 200  $\mu$ mol (2 eq) of dextran-amino and 1 mmol (100 eq) of DMT-MM. The resulting mixture was stirred at ambient temperature for 19 hours. The mixture was purified by PD-10 desalting column using distilled water, lyophilized to afford compound 35 as a yellow powder.

**Synthesis of compound 36** Compound 30 (9.33 mg, 20.2  $\mu$ mol) was dissolved in 1 mL of anhydrous DMF. N-hydroxy succinimide (NHS) (12.0 mg, 104  $\mu$ mol, 5.1 eq), WSCD  $\cdot$  HCl (11.6 mg, 60.4  $\mu$ mol, 3eq) and N,N-diisopropylethyl amine (DIEA) (18  $\mu$ L, 110  $\mu$ mol, 5.4 eq) were added, stirred at 30°C for 48 h. After complete consumption of Compound 36 was checked with HPLC and mass spectroscopy, the reaction mixture was used to next reaction without further purification.

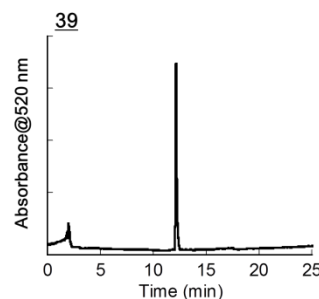
**Synthesis of compound 37** The tripeptide was prepared according to the standard Fmoc solid-phase peptide synthesis protocol. Briefly, Rink amide MBHA resin (83 mg, 50  $\mu$ mol) was placed in a reaction vessel. Subsequently, Fmoc-protected amino acids were sequentially coupled to the resin-bound amino acid from the carboxyl to amino terminus. HATU and DIEA were used for each coupling, and DMF was used as the solvent. For deprotection steps piperidine (20 %) in DMF was used.

Before peptide cleavage, compound 36 (20.2  $\mu$ mol) and DIEA (40  $\mu$ L, 250  $\mu$ mol, 12 eq) dissolved in 1.5 mL DMF was added and shaken at 25°C for 48 h, then the resin was washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and DMF. Peptide cleavage from the resin was accomplished by shaking with TFA/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25:75 v/v) for 1.5 h. The reaction mixture was evaporated and purified by means of semi-preparative HPLC under the following conditions: A/B = 80/20-0/100 (15 min). (solvent A: H<sub>2</sub>O with 0.1% TFA, solvent B; acetonitrile/H<sub>2</sub>O= 80/20 with 0.1% TFA). The fractions containing the desired product were collected and lyophilized to afford compound 37 (10.9 mg, 71% in two steps, calculated on the basis of compound 30.) Trace amount of <sup>t</sup>Bu-37 was obtained. HRMS (ESI): calcd 763.1162 for [M-H]<sup>-</sup>; found 763.1123 (-3.9 mmu) <sup>t</sup>Bu-37 HRMS (ESI): calcd 819.1788 for [M-H]<sup>-</sup>; found 819.1784 (-0.4 mmu)

**Synthesis of compound 38** Compound 37 (10.9 mg, 14.3  $\mu$ mol) and compound 3 (6.0 mg, 8.46  $\mu$ mol, 0.6 eq) was dissolved in 1 mL of anhydrous DMF. HATU (12.6 mg, 33.2  $\mu$ mol, 3.9 eq) and DIEA (17.7  $\mu$ L, 102  $\mu$ mol, 7 eq) were added, stirred at ambient temperature under argon atmosphere for 48 h. The reaction mixture was purified by means of semi-preparative HPLC under the following conditions: A/B = 99/1-0/100 (15 min). (solvent A: H<sub>2</sub>O with 0.1% TFA, solvent B; acetonitrile/H<sub>2</sub>O= 80/20 with 0.1% TFA). The fractions containing the desired product were collected, evaporated and lyophilized to afford compound 38 (3.5 mg, 17%) as yellow solid. HRMS (ESI<sup>-</sup>): calcd 1453.5155 for [M-H]<sup>-</sup>; found 1453.5161 (0.6 mmu) HPLC analysis was performed by monitoring absorbance at 380 nm, using linear gradient 80/20-0/100 (15 min), (solvent A: H<sub>2</sub>O with 0.1% TFA, solvent B; acetonitrile/H<sub>2</sub>O= 80/20 with 0.1% TFA). Rt was 9.9 min.



**Synthesis of compound 39** Compound 11 (100  $\mu$ L of 1 mM DMSO solution, 100 nmol), biotin-PEG<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (120  $\mu$ L of 1 mM DMSO solution, 120 nmol, 1.2 eq) and DIEA (2  $\mu$ L of 100 mM DMSO solution, 200 nmol, 2 eq) were mixed and stirred at ambient temperature for 12 h. Resulting mixture was purified by means of semi-preparative HPLC under the following conditions: A/B = 70/30-0/100 (20 min). (solvent A: H<sub>2</sub>O with 0.1% TFA, solvent B; acetonitrile/H<sub>2</sub>O= 80/20 with 0.1% TFA). The fractions containing the desired product were collected and lyophilized to afford compound 39 (TLBiotin) (40 nmol, 40%) as red solid. HRMS (ESI<sup>+</sup>): calcd 710.8764 for [M-F+H]<sup>2+</sup>; found 710.8787 (2.3 mmu). HPLC analysis was performed by monitoring absorbance at 522 nm, using linear gradient 70/30-0/100 (20 min), (solvent A: H<sub>2</sub>O with 0.1% TFA, solvent B; acetonitrile/H<sub>2</sub>O= 80/20 with 0.1% TFA). Rt was 12.0 min.



**Synthesis of compound 40** To the PBS solution of avidin (36.5  $\mu$ M, 100  $\mu$ L) was added compound 39 (TLBiotin) (32  $\mu$ L 0.4 mM DMSO solution, 3.5 eq) and incubated at 25°C for 4 hour. The reaction mixture was purified by PD-10 desalting column to remove unlabeled K<sup>+</sup> probe.

## 発表状況

本論文の内容は以下のように発表されている。

### 国際学会・シンポジウム等における発表

Tomoya Hirata, Takuya Terai, Tetsuo Nagano and Kenjiro Hanaoka “Development of a hybrid potassium ion probe for detection of potassium ion efflux on cellular membrane” ISACS 11: Challenges in Chemical Biology Conference Poster presentation, July, 2013, Stata Center, MIT Massachusetts, USA

Tomoya Hirata, Takuya Terai, Tetsuo Nagano and Yasuteru Urano “Development of a hybrid potassium ion probe for detection of local potassium ion transition on cellular membrane” EMBO Conference Series Chemical Biology 2014, August, 2014, EMBL Heidelberg, Germany

### 国内学会・シンポジウム等における発表

#### ・ポスター発表(査読あり)

○平田智也、寺井琢也、下西学、長野哲雄「K<sup>+</sup>チャネル活性の高感度検出を目指した複合型 K<sup>+</sup>プローブの開発」日本ケミカルバイオロジー学会第 7 回年会（京都）2012 年 7 月

○平田智也、寺井琢也、下西学、長野哲雄「細胞膜上で K<sup>+</sup>流出を可視化する複合型蛍光プローブの開発」日本薬学会第 133 回年会（横浜）2013 年 3 月

○平田智也、寺井琢也、長野哲雄、花岡健二郎「K<sup>+</sup>チャネル活性の蛍光イメージングを指向した複合型 K<sup>+</sup>プローブの開発」第 8 回日本分子イメージング学会（横浜）2013 年 5 月

○平田智也、寺井琢也、長野哲雄、花岡健二郎「細胞膜上でカリウムイオン流出を可視化する複合型蛍光プローブの開発」第 1 回バイオ関連化学シンポジウム若手フォーラム（名古屋）2013 年 9 月

○平田智也、寺井琢也、長野哲雄、花岡健二郎「細胞膜上でカリウムイオン流出を可視化する複合型蛍光プローブの開発」第 7 回バイオ関連化学シンポジウム（名古屋）2013 年 9 月



○平田智也、寺井琢也、長野哲雄、浦野泰照「細胞膜上での局所的かつ一時的なカリウムイオン濃度変化を可視化する複合型蛍光プローブの開発」日本薬学会第 134 回年会（熊本）2014 年 3 月

○平田智也、寺井琢也、長野哲雄、浦野泰照 “Development of a hybrid potassium ion probe for detection of local potassium ion transition on cellular membrane” CBI 学会 2014 年大会（東京）2014 年 10 月

○平田智也、寺井琢也、長野哲雄、浦野泰照「細胞膜近傍のカリウムイオン濃度変化を可視化するタンパク質複合型蛍光プローブの開発」日本薬学会第 135 回年会（兵庫）2015 年 3 月

## 第八章

## 参考文献

## 第八章 参考文献

1. Bear, M. F. C., B. W.; Paradiso, M. A., Neuroscience: Exploring the Brain, 3rd Edition. *Lippincott Williams and Wilkins; 3rd edition* **2006**.
2. Park, E. H.; Durand, D. M., Role of potassium lateral diffusion in non-synaptic epilepsy: a computational study. *J. Theor. Biol.* **2006**, *238*(3), 666-82.
3. Wallraff, A.; Köhling, R.; Heinemann, U.; Theis, M.; Willecke, K.; Steinhäuser, C., The impact of astrocytic gap junctional coupling on potassium buffering in the hippocampus. *J. Neurosci.*, **2006**, *26*(20), 5438-5447.
4. Frohlich, F.; Bazhenov, M.; Iragui-Madoz, V.; Sejnowski, T. J., Potassium dynamics in the epileptic cortex: new insights on an old topic. *Neuroscientist* **2008**, *14*(5), 422-33.
5. Durand, D. M.; Park, E. H.; Jensen, A. L., Potassium diffusive coupling in neural networks. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **2010**, *365*(1551), 2347-62.
6. de Lanerolle, N. C.; Lee, T.-S. S.; Spencer, D. D., Astrocytes and epilepsy. *Neurotherapeutics*, **2010**, *7*(4), 424-438.
7. Busse, R.; Edwards, G.; Feletou, M.; Fleming, I.; Vanhoutte, P. M.; Weston, A. H., EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol. Sci.* **2002**, *23*(8), 374-380.
8. Feletou, M.; Vanhoutte, P. M., Endothelium-derived hyperpolarizing factor - Where are we now? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2006**, *26*(6), 1215-1225.
9. Edwards, G.; Dora, K. A.; Gardener, M. J.; Garland, C. J.; Weston, A. H., K<sup>+</sup> is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature* **1998**.
10. Peterka, D. S.; Takahashi, H.; Yuste, R., Imaging voltage in neurons. *Neuron* **2011**, *69*(1), 9-21.
11. Grinvald, A.; Fine, A.; Farber, I. C.; Hildesheim, R., Fluorescence monitoring of electrical responses from small neurons and their processes. *Biophys. J.* **1983**.
12. Fluhler, E.; Burnham, V. G.; Loew, L. M., Spectra, membrane binding, and potentiometric responses of new charge shift probes. *Biochemistry* **1985**.
13. González; Oades; Leychik; Harootunian; Negulescu, Cell-based assays and instrumentation for screening ion-channel targets. *Drug Discovery Today* **1999**, *4*(9), 431-439.
14. Cacciatore, T. W.; Brodfuehrer, P. D.; Gonzalez, J. E.; Jiang, T., Identification of neural circuits by imaging coherent electrical activity with FRET-based dyes. *Neuron* **1999**.
15. Danker, T.; Gassner, B.; Oberleithner, H.; Schwab, A., Extracellular detection of K<sup>+</sup> release during migration of transformed Madin-Darby canine kidney cells. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* **1996**, *433*(1-2), 71-76.

16. Messerli, M. A.; Collis, L. P.; Smith, P. J., Ion trapping with fast-response ion-selective microelectrodes enhances detection of extracellular ion channel gradients. *Biophys. J.* **2009**, *96*(4), 1597-1605.
17. Minta, A.; Tsien, R. Y., Fluorescent indicators for cytosolic sodium. *J Biol Chem* **1989**, *264*(32), 19449-57.
18. Marko, L.; Jasna, M.; Andreas, F.; Zeljko, J. B.; Martin, B., Targeted expression of Kir6.2 in mitochondria confers protection against hypoxic stress. *The Journal of Physiology* **2006**.
19. Zhou, X.; Wei, J.; Song, M.; Francis, K.; Yu, S. P., Novel role of KCNQ2/3 channels in regulating neuronal cell viability. *Cell Death Differ.* **2010**, *18*(3), 493-505.
20. Dongdong, C.; Mingke, S.; Osama, M.; Shan Ping, Y., Inhibition of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase induces hybrid cell death and enhanced sensitivity to chemotherapy in human glioblastoma cells. *BMC Cancer* **2014**.
21. De-Ming, K.; Yong, E. M.; Jun-Hong, G.; Wei, Y.; Han-Xi, S., Fluorescent Sensor for Monitoring Structural Changes of G-Quadruplexes and Detection of Potassium Ion. *Anal. Chem.* **2009**, *81*(7), 2678-2684.
22. Shigeori, T.; Bernard, J., Fluorescence Detection of Potassium Ion Using the G-Quadruplex Structure. *Anal. Sci.* **2011**, *27*(12), 1167.
23. He, H.; Mortellaro, M. A.; Leiner, M. J.; Fraatz, R. J.; Tusa, J. K., A fluorescent sensor with high selectivity and sensitivity for potassium in water. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*(6), 1468-1469.
24. Padmawar, P.; Yao, X.; Bloch, O.; Manley, G. T.; Verkman, A. S., K<sup>+</sup> waves in brain cortex visualized using a long-wavelength K<sup>+</sup>-sensing fluorescent indicator. *Nat. Methods* **2005**, *2*(11), 825-7.
25. Magzoub, M.; Padmawar, P.; Dix, J.; Verkman, A., Millisecond association kinetics of K<sup>+</sup> with triazacryptand-based K<sup>+</sup> indicators measured by fluorescence correlation spectroscopy. *J. Phys. Chem. B*, **2006**, *110*(42), 21216-21221.
26. Carpenter, R. D.; Verkman, A. S., Function-Oriented Synthesis of a Didesmethyl Triazacryptand Analogue for Fluorescent Potassium Ion Sensing. *European J Org Chem* **2011**, *2011*(7), 1242-1248.
27. Hirata, T.; Terai, T.; Komatsu, T.; Hanaoka, K.; Nagano, T., Development of a potassium ion-selective fluorescent sensor based on 3-styrylated BODIPY. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*(20), 6090-6093.
28. Zhou, X.; Su, F.; Gao, W.; Tian, Y.; Youngbull, C.; Johnson, R. H.; Meldrum, D. R., Triazacryptand-based fluorescent sensors for extracellular and intracellular K<sup>+</sup> sensing. *Biomaterials* **2011**, *32*(33), 8574-83.

29. Zhou, X.; Su, F.; Tian, Y.; Youngbull, C.; Johnson, R. H.; Meldrum, D. R., A new highly selective fluorescent K<sup>+</sup> sensor. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (46), 18530-3.
30. Namkung, W.; Padmawar, P.; Mills, A. D.; Verkman, A. S., Cell-based fluorescence screen for K<sup>+</sup> channels and transporters using an extracellular triazacryptand-based K<sup>+</sup> sensor. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (25), 7794-5.
31. Namkung, W.; Song, Y.; Mills, A. D.; Padmawar, P.; Finkbeiner, W. E.; Verkman, A. S., In situ measurement of airway surface liquid [K<sup>+</sup>] using a ratioable K<sup>+</sup>-sensitive fluorescent dye. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (23), 15916-26.
32. Urano, Y.; Kamiya, M.; Kanda, K.; Ueno, T.; Hirose, K.; Nagano, T., Evolution of fluorescein as a platform for finely tunable fluorescence probes. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (13), 4888-94.
33. Loudet, A.; Burgess, K., BODIPY dyes and their derivatives: syntheses and spectroscopic properties. *Chem. Rev.* **2007**, *107* (11), 4891-4932.
34. Ulrich, G.; Ziessel, R.; Harriman, A., The chemistry of fluorescent bodipy dyes: versatility unsurpassed. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 1184 – 1201.
35. Komatsu, T.; Urano, Y.; Fujikawa, Y.; Kobayashi, T.; Kojima, H.; Terai, T.; Hanaoka, K.; Nagano, T., Development of 2,6-carboxy-substituted boron dipyrromethene (BODIPY) as a novel scaffold of ratiometric fluorescent probes for live cell imaging. *Chem Commun (Camb)* **2009**, (45), 7015-7.
36. Iyoshi, S.; Taki, M.; Yamamoto, Y., Development of a cholesterol-conjugated fluorescent sensor for site-specific detection of zinc ion at the plasma membrane. *Org. Lett.* **2011**, *13* (17), 4558-4561.
37. Li, D.; Chen, S.; Bellomo, E. A.; Tarasov, A. I.; Kaut, C.; Rutter, G. A.; Li, W. H., Imaging dynamic insulin release using a fluorescent zinc indicator for monitoring induced exocytotic release (ZIMIR). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2011**, *108* (52), 21063-8.
38. Kim, H. J.; Han, J. H.; Kim, M. K.; Lim, C. S.; Kim, H. M.; Cho, B. R., Dual-color imaging of sodium/calcium ion activities with two-photon fluorescent probes. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49* (38), 6786-9.
39. Etter, E. F.; Kuhn, M. A.; Fay, F. S., Detection of changes in near-membrane Ca<sup>2+</sup> concentration using a novel membrane-associated Ca<sup>2+</sup> indicator. *The Journal of biological chemistry* **1994**, *269* (13), 10141-10149.
40. 大崎隆, 修士論文. **2006**.
41. Urano, Y.; Asanuma, D.; Hama, Y.; Koyama, Y.; Barrett, T.; Kamiya, M.; Nagano, T.; Watanabe, T.; Hasegawa, A.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H., Selective molecular imaging of viable cancer cells with pH-activatable fluorescence probes. *Nat. Med.* **2009**, *15* (1), 104-9.
42. Mitsunaga, M.; Ogawa, M.; Kosaka, N.; Rosenblum, L. T.; Choyke, P. L.; Kobayashi,

- H., Cancer cell-selective in vivo near infrared photoimmunotherapy targeting specific membrane molecules. *Nat. Med.* **2011**, *17*(12), 1685-91.
43. Hama, Y.; Urano, Y.; Koyama, Y.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H., Targeted optical imaging of cancer cells using lectin-binding BODIPY conjugated avidin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *348*(3), 807-813.
  44. Hama, Y.; Urano, Y.; Koyama, Y.; Kamiya, M.; Bernardo, M.; Paik, R. S.; Shin, I. S.; Paik, C. H.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H., A target cell-specific activatable fluorescence probe for in vivo molecular imaging of cancer based on a self-quenched avidin-rhodamine conjugate. *Cancer Res.* **2007**, *67*(6), 2791-2799.
  45. Juillerat, A.; Gronemeyer, T.; Keppler, A.; Gendreizig, S., Directed Evolution of O6-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase for Efficient Labeling of Fusion Proteins with Small Molecules In Vivo. *Chem. Biol.* **2003**, *10*(4), 313-7.
  46. Gautier, A.; Juillerat, A.; Heinis, C.; Correa, I. R., Jr.; Kindermann, M.; Beaufils, F.; Johnsson, K., An engineered protein tag for multiprotein labeling in living cells. *Chem. Biol.* **2008**, *15*(2), 128-36.
  47. Los, G.; Encell, L.; McDougall, M.; Hartzell, D.; Karassina, N.; Zimprich, C.; Wood, M.; Learish, R.; Ohana, R.; Urh, M.; Simpson, D.; Mendez, J.; Zimmerman, K.; Otto, P.; Vidugiris, G.; Zhu, J.; Darzins, A.; Klaubert, D.; Bulleit, R.; Wood, K., HaloTag: a novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis. *ACS Chem. Biol.*, **2008**, *3*(6), 373-382.
  48. Hori, Y.; Ueno, H.; Mizukami, S.; Kikuchi, K., Photoactive yellow protein-based protein labeling system with turn-on fluorescence intensity. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*(46), 16610-16611.
  49. Kamiya, M.; Johnsson, K., Localizable and highly sensitive calcium indicator based on a BODIPY fluorophore. *Anal. Chem.* **2010**, *82*(15), 6472-6479.
  50. Abo, M.; Minakami, R.; Miyano, K.; Kamiya, M.; Nagano, T.; Urano, Y.; Sumimoto, H., Visualization of phagosomal hydrogen peroxide production by a novel fluorescent probe that is localized via SNAP-tag labeling. *Anal. Chem.* **2014**, *86*(12), 5983-5990.
  51. Srikun, D.; Albers, A. E.; Nam, C. I.; Iavarone, A. T.; Chang, C. J., Organelle-targetable fluorescent probes for imaging hydrogen peroxide in living cells via SNAP-Tag protein labeling. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*(12), 4455-4465.
  52. Tomat, E.; Nolan, E. M.; Jaworski, J.; Lippard, S. J., Organelle-specific zinc detection using zinpyr-labeled fusion proteins in live cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*(47), 15776-15777.
  53. Wu, H.; Franklin, C.; Kim, H.; Turner, J., Regulation of calcium-activated potassium efflux by neurotensin and other agents in HT-29 cells. *Am. J. Physiol.*, **1991**, *260*

(1 Pt 1), 42.

54. Yamaguchi Y, D. D., Sato Y, Hou YT, Watanabe R, Sasaki K, Kawabe M, Hirano E, Morinaga T., Silicate fiber-based 3D cell culture system for anticancer drug screening. *Anticancer Res.* **2013**, *33*(12), 5301-9.
55. Gackière, F.; Warnier, M.; Katsogiannou, M.; Derouiche, S.; Delcourt, P.; Dewailly, E.; Slomianny, C.; Humez, S.; Prevarskaya, N.; Roudbaraki, M.; Mariot, P., Functional coupling between large-conductance potassium channels and Cav3.2 voltage-dependent calcium channels participates in prostate cancer cell growth. *Biology open* **2013**, *2* (9), 941-951.
56. Nechiporuk-Zloy, V.; Stock, C.; Schillers, H.; Oberleithner, H.; Schwab, A., Single plasma membrane K<sup>+</sup> channel detection by using dual-color quantum dot labeling. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **2006**, *291* (2), 9.
57. Rizzuto, R.; Pozzan, T., Microdomains of intracellular Ca<sup>2+</sup>: molecular determinants and functional consequences. *Physiol. Rev.* **2006**, *86*(1), 369-408.
58. Parekh, A. B., Ca<sup>2+</sup> microdomains near plasma membrane Ca<sup>2+</sup> channels: impact on cell function. *J. Physiol.*, **2008**, *586*(13), 3043-3054.
59. Shang, W.; Lu, F.; Sun, T.; Xu, J.; Li, L.-L. L.; Wang, Y.; Wang, G.; Chen, L.; Wang, X.; Cannell, M. B.; Wang, S.-Q. Q.; Cheng, H., Imaging Ca<sup>2+</sup> nanosparks in heart with a new targeted biosensor. *Circul. Res.* **2014**, *114*(3), 412-420.
60. Wang, L.; Sigworth, F. J., Structure of the BK potassium channel in a lipid membrane from electron cryomicroscopy. *Nature* **2009**, *461* (7261), 292-295.
61. Masanta, G.; Lim, C. S.; Kim, H. J.; Han, J. H.; Kim, H. M.; Cho, B. R., A mitochondrial-targeted two-photon probe for zinc ion. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (15), 5698-700.
62. Baek, N. Y.; Heo, C. H.; Lim, C. S.; Masanta, G.; Cho, B. R.; Kim, H. M., A highly sensitive two-photon fluorescent probe for mitochondrial zinc ions in living tissue. *Chem Commun (Camb)* **2012**, *48*(38), 4546-8.
63. Sartiani, L.; Bettiol, E.; Stillitano, F.; Mugelli, A.; Cerbai, E.; Jaconi, M. E., Developmental changes in cardiomyocytes differentiated from human embryonic stem cells: a molecular and electrophysiological approach. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **2007**, *25* (5), 1136-1144.
64. Mummery, C. L.; Zhang, J.; Ng, E. S.; Elliott, D. A.; Elefanty, A. G.; Kamp, T. J., Differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to cardiomyocytes: a methods overview. *Circul. Res.* **2012**, *111* (3), 344-358.
65. Parker, C. A.; Rees, W. T., Correction of fluorescence spectra and measurement of fluorescence quantum efficiency. *The Analyst* **1960**, *85*(1013), 587.

66. Glenn, A. C.; James, N. D., Measurement of photoluminescence quantum yields. Review. *J. Phys. Chem.*, **1971**, *75*(8), 991–1024
67. Kamoto, M.; Umezawa, N.; Kato, N.; Higuchi, T., Novel probes showing specific fluorescence enhancement on binding to a hexahistidine tag. *Chemistry*, **2008**, *14* (26), 8004-8012.
68. Yamamura, H.; Ikeda, C.; Suzuki, Y.; Ohya, S.; Imaizumi, Y., Molecular assembly and dynamics of fluorescent protein-tagged single KCa1.1 channel in expression system and vascular smooth muscle cells. *American journal of physiology. Cell physiology* **2012**, *302* (8), 68.
69. Woodroffe, C. C.; Lim, M. H.; Bu, W.; Lippard, S. J., Synthesis of isomerically pure carboxylate- and sulfonate-substituted xanthene fluorophores. *Tetrahedron* **2005**, *61* (12), 3097-3105.
70. Zhang, Y.; So, M. K.; Loening, A. M.; Yao, H.; Gambhir, S. S.; Rao, J., HaloTag protein-mediated site-specific conjugation of bioluminescent proteins to quantum dots. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45* (30), 4936-40.
71. Romieu, A.; Brossard, D.; Hamon, M.; Outaabout, H.; Portal, C.; Renard, P.-Y. Y., Postsynthetic derivatization of fluorophores with alpha-sulfo-beta-alanine dipeptide linker. Application to the preparation of water-soluble cyanine and rhodamine dyes. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*(1), 279-289.



## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始親身に御指導並びに御教授を賜りました東京大学大学院薬学系研究科薬品代謝化学教室・浦野泰照教授に深く感謝申し上げます。

研究生活において、直接御指導頂きました同教室・寺井琢也助教に深く感謝致します。また、研究者としてあるべき姿を常に示すと共に、非常に多くの貴重な御指導、御助言を頂きました同教室・花岡健二郎准教授、上野匡助教、革新創薬化学教室の小松徹助教、創薬オープンイノベーションセンターの長野哲雄客員教授へ心より感謝申し上げます。

タンパク質の発現、精製に関して、懇切丁寧な技術指導を行って頂きました大日本住友製薬の下西学博士、並びに充実した設備を快く使わせて頂き、また実験に関しても度々御助言を頂きました東京大学創薬オープンイノベーションセンターの皆様へ心より感謝申し上げます。

HaloTag 融合タンパク質の発現コンストラクトおよび安定発現細胞を快く譲っていただいた、かずさ DNA 研究所の長瀬隆弘博士へ深く感謝致します。

K<sup>+</sup>チャンネルに関して御教授下さった名古屋市立大学大学院薬学系研究科細胞分子薬効解析学分野の今泉祐治教授、山村寿男准教授に心より感謝申し上げます。

日々の研究生活の中で時に励ましあい、時に議論を交わし、様々な苦楽を共にしてきた同期生の朴文氏、坂本裕樹氏を始めとする薬品代謝化学教室の皆様に、心より感謝申し上げます。

最後に、これまでの学生生活を温かく見守り、常に支え続けてくれた家族に心より感謝致します。

2015 年 1 月

東京大学大学院薬学系研究科・薬品代謝化学教室

平田 智也