

皮膚の生理機能解明を目指した カルシウムイオン蛍光プローブの開発とその応用

東京大学大学院薬学系研究科

花岡 健二郎

The development of sophisticated fluorescence sensor probes has contributed to elucidation of the molecular mechanisms of many complex biological phenomena. In particular, calcium ion (Ca^{2+}) is a pivotal second messenger inside cells, and fluctuation of intracellular Ca^{2+} works together with various biomolecules in biological systems. So, we expect that simultaneous visualization of Ca^{2+} and other biomolecules, i.e., multicolor imaging, brings us many biological findings. However, color choices are not sufficient at present, that is, reported long wavelength fluorescence probes for Ca^{2+} have some disadvantages. For example, AM ester form of Rhod-2, one of the most widely used red fluorescence probe for Ca^{2+} , often localizes into mitochondria and monitors mitochondrial Ca^{2+} concentration change, although cytoplasmic Ca^{2+} is much more important for the research of Ca^{2+} signaling. Thus, we set out to develop a red fluorescence probe for Ca^{2+} with excellent properties including the cytoplasmic distribution to elucidate cytoplasmic Ca^{2+} -related biological phenomena such as hydraulic pressure stimulation in skin and epithelial wound-healing.

So far, we have developed a novel fluorescein analogue, TokyoMagenta (TM), in which the O atom at the 10 position of the xanthene chromophore of fluorescein is replaced with a Si atom. The absorption and emission wavelengths of TM were about 90 nm longer than those of TokyoGreen (a fluorescein derivative). In this study, we introduced chlorine into the fluorophore and developed dichloro TokyoMagenta (DCTM). Then, by utilizing DCTM, we developed a red fluorescence probe for Ca^{2+} , CaTM-2, and its activation ratio of the fluorescence intensity reaching 16-fold was practically useful. The chlorination of the fluorophore was also advantageous, and the $\text{p}K_a$ value of CaTM-2 was greatly shifted to the acidic region compared with that of TM, and was sufficiently low ($\text{p}K_a = 5.1$) for practical use. For cellular application, we synthesized CaTM-2 AM, an AM ester form of CaTM-2. CaTM-2 AM diffused into cytosol uniformly in living cells, and showed the change in its fluorescence intensity by the histamine stimulus, monitoring the change of the cytoplasmic Ca^{2+} concentration. As a further demonstration of the usefulness of CaTM-2 AM, we confirmed that it could be applied to rat hippocampal slice cultures for monitoring activities of neurons. Thus, CaTM-2 and CaTM-2 AM would provide an innovative approach for researchers to work on many challenges related to Ca^{2+} .

1. 緒言

我々生物を構成する細胞の内側では、タンパク質や金属イオンなどの無数の生体分子がその濃度、局在、活性を連続的に変化させ、細胞の機能や恒常性を制御している。つまり、それら分子の協奏によって、個々の細胞は情報伝達を行い、アポトーシスなどの多岐に渡る生体応答を引き起こしている。そのため、細胞内におけるそれら生体分子の挙動を継時的に時々刻々と解析することは生物学研究において極めて重要であり、これまでに多くの研究が行われてきた。その中でも、蛍光分子や蛍光タンパク質を用いたバイオイメージング技術は細胞内における様々な生体分子の挙動をリアルタイムに観察する手法として有用であり、今日の生命科学研究の進展に大きく貢献している。我々は近年、さらに高度な蛍光イメージングを可能とすべく、有機小分子を基礎とした新たな蛍光団の開発とその応用に取り

組んでおり¹⁻⁴⁾、本研究では皮膚の生理機能の解明を目指し、新たなカルシウムイオン蛍光プローブの開発を行った。近年、皮膚の表面電位は表皮が起こしていること、また、表皮が正常に機能する上でイオンポンプの働きが重要であることが分かっている。この表面電位において、カルシウムイオンは角層の直下に分布し、皮膚の正常な機能の維持において重要な役割を担っていることが報告されている。このように、皮膚の生理機構とカルシウムイオンは深く関わっている⁵⁻⁷⁾。そこで、培養細胞レベルのみならず、動物個体レベルおよび組織レベルでの応用をも視野に入れて、赤色光領域でのカルシウム蛍光プローブの開発を行った。これまでに汎用されている緑色領域 (500nm 程度) より更に長い赤色の蛍光波長を有する蛍光プローブを開発することで、より低い自家蛍光および高い組織透過性、マルチカラーイメージングへの応用が期待され、より詳細にカルシウムイオンの役割を解明できると期待される。

2. 実験・結果

2.1 赤色蛍光を有するフルオレセイン類似蛍光色素 TokyoMagenta 類の開発

蛍光イメージングにおいて、蛍光団を特定の標的分子を検出できるようにセンサー化した化合物、すなわち、蛍光プローブが汎用されており、有機小分子をもととした蛍光



Development of a red fluorescence probe for monitoring dynamics of cytoplasmic calcium ion to elucidate physiological mechanism in skin

Kenjiro Hanaoka

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo

プローブの蛍光団母核として、「フルオレセイン」という緑色蛍光色素が特に汎用されている (図1a: TokyoGreenはフルオレセインの誘導体である)。これはフルオレセインが、高い水溶性、高い蛍光量子収率、確立した蛍光制御機構など蛍光プローブの蛍光団母核として多くの長所を有しているためである。例えば、生細胞染色に用いられている Calcein AMや、カルシウムプローブ Fluo-3、Fluo-4などはフルオレセインを蛍光団母核として用いた蛍光プローブの代表例であり、実際に、現在多くの生物学研究に応用されている^{8,9)}。このようなフルオレセイン骨格を用いて開発された蛍光プローブは生物学研究に必要な不可欠なものとなっているが、それらは全て緑色光の波長領域に蛍光波長を有するため、例えば、汎用される緑色蛍光タンパク GFPを発現させた細胞や動物に応用することや、他の緑色蛍光プローブとの共染色を行うことは不可能である。そこで我々は、フルオレセインの蛍光プローブの蛍光団母核としての優れた特性を保持したまま、長波長蛍光を有する新たな蛍光団を開発し、それによってマルチカラーイメージングなど蛍光イメージングの可能性をさらに大きく広げることを目指している。このような蛍光波長を赤色光や近赤外光の波長領域へと移動させることは、自家蛍光を低く抑え、かつ、高い組織透過性をも得ることができる。以下にこれまでに開発に成功している赤色蛍光団であるフルオ

レセイン類似蛍光色素 TokyoMagenta類について説明させて頂く。

長波長蛍光を有するフルオレセイン類似色素を、フルオレセインにおけるキサンテン環の10位O原子を他の原子に置換することにより開発することを試みた。これまでに、キサンテン環上の π 共役系近傍にSi-Me結合が存在することで、キサンテン環上の π 軌道および、Si-Me結合の σ^* 軌道とが結合性相互作用を起こし、LUMOが安定化することが報告されている^{10,11)}。これをもとに、我々は10位Si置換フルオレセイン類 TokyoMagenta (TM) の設計、開発を行った (図1a, b)¹²⁾。その結果、狙い通りに水溶液中でのTMの吸収波長、蛍光波長が共に、フルオレセイン誘導体である TokyoGreen (TG) と比較して90nmもの大きな長波長化を示した (図1c, d)。さらに、分子軌道計算によってTM、TGのHOMOおよびLUMOエネルギーレベルを計算したところ、TGと比較してTMのLUMOエネルギーレベルは大きく低下しており、このLUMOエネルギーレベルの安定化が波長変化の主な要因であると考えている (図1e)。

2.2 β -ガラクトシダーゼ活性検出蛍光プローブの開発

光学特性を精査する中で、TMに特徴的な光学特性を見出した。TGおよびTMにはpH依存的にアニオン型、ニ

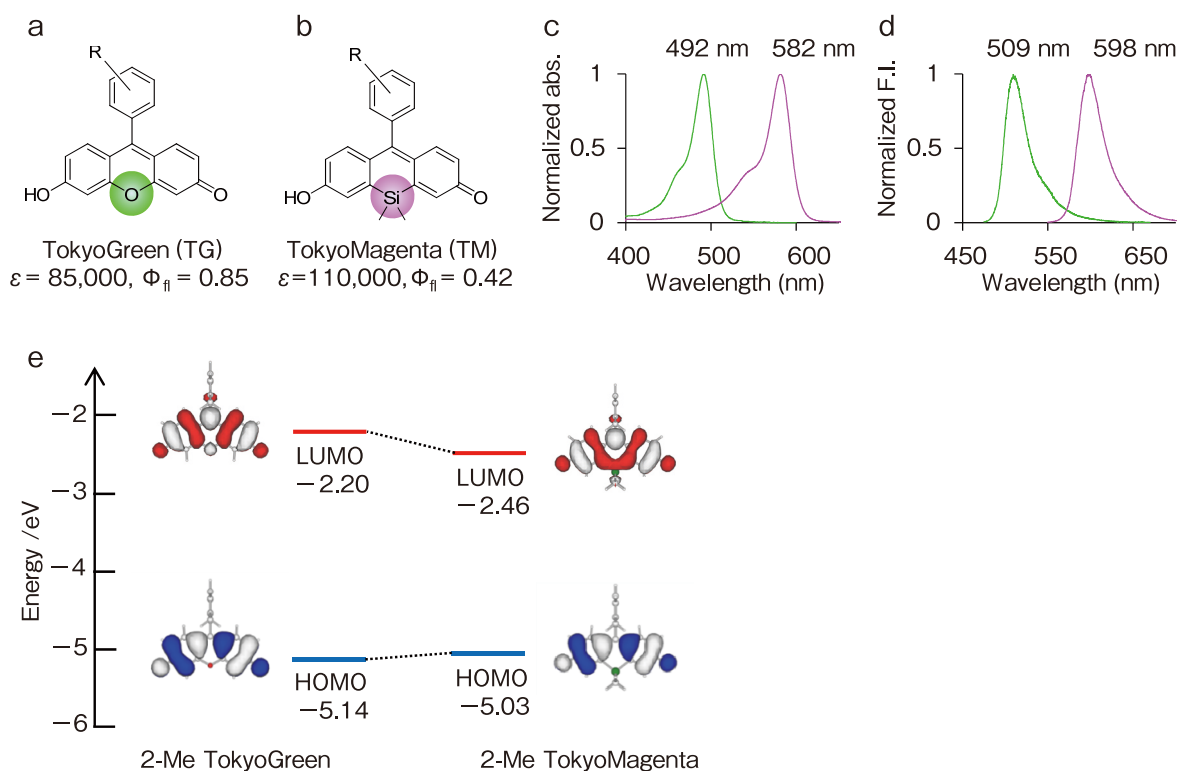


図1 (a, b) TokyoGreen (a)、および TokyoMagenta (b) の分子構造、モル吸光係数 (ϵ)、蛍光量子収率 (Φ_{fl}) (ϵ 、 Φ_{fl} は、共に R = 2-Me 体を用いて測定)。(c, d) 2-Me TokyoGreen (緑)、および 2-Me TokyoMagenta (赤) のリン酸ナトリウムバッファー (pH 9) 中での吸収 (c)、蛍光 (d) スペクトル。(e) Gaussian 09 を用いた時間依存密度汎関数法 (TDDFT) による分子軌道計算により算出した HOMO および LUMO エネルギーレベル。

ニュートラル型の平衡が存在し、アニオン型は強蛍光性、ニュートラル型は弱蛍光性を示す (図2a)。それら構造変化に伴う最大吸収波長の変化は、TGでは53nmであるのに対し、TMでは111nmと非常に大きな値を示した (図2b)。この実験結果から、キサンテン環の酸素原子上の構造変化をスイッチとすることで、高いS/Nを示す蛍光プローブの開発が可能であると考えた。つまり、ニュートラル型とキサンテン環上の酸素原子がアルキル化された化合物とが類似の光学特性を示すと推測し、例えば、アルキル化されたTM誘導体が標的分子とする特定の酵素などにより脱アルキル化を受けることでアニオン型のTMが生成し、その際、アニオン型のプローブ分子のみが励起されるよう励起波長を適切に選択することで、大きな蛍光強度上昇が実現できると考えた。実際に、この蛍光プローブの分子設計戦略が可能であるか検証するため、我々は β -ガラクトシダーゼの基質となる蛍光プローブ、2-Me TM β gal の設計、開発を行った (図3a)。2-Me TM β gal の吸収スペクトルは2-Me TMのニュートラル型のスペクトルと類似しており、 β -ガラクトシダーゼとの酵素反応により吸収波長は大きなレッドシフトを示した (図3b)。さらに、プローブ分子

を選択的にアニオン型での最大吸収波長で励起することで、酵素反応前後での大きな蛍光強度上昇を実現した (図3c)。このように励起波長を適切に選択することでアニオン型のプローブ分子を選択的に励起することができたのは、アニオン型とニュートラル型の111nmもの非常に大きな吸収波長の変化に因るものである。さらに、2-Me TM β gal を HEK293 β -ガラクトシダーゼ高発現細胞 (lacZ+) および非発現細胞 (lacZ-) にロードしたところ、高発現細胞からのみ強い蛍光が観察された (図3d, e)。これまでにTGを母核とした β -ガラクトシダーゼプローブも報告されているが、これはベンゼン環部位の酸化電位を厳密に制御し光誘起電子移動によって蛍光強度の大きな変化を実現している¹³⁾。そのため、TGを用いたプローブではベンゼン環部位の分子構造が大きく制限されている。一方でTMを用いた波長変化型プローブでは、ベンゼン環部位の酸化電位の厳密な制御が不必要であり、水溶性官能基や細胞内局在制御構造などをベンゼン環部位へと付与できるため、様々な目的に応じた自由度の高い分子設計が可能であり、より個々の研究目的に適合した蛍光プローブの開発が可能であると考えている。

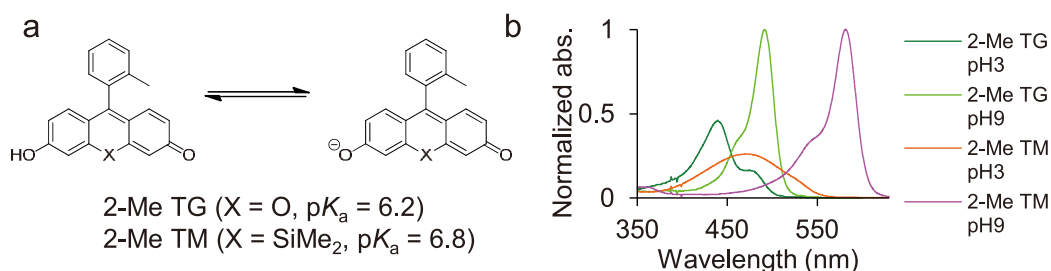


図2 (a) TG、TMのpH依存的な平衡。(b) TG、TMの酸性および、塩基性水溶液中での吸収スペクトル。

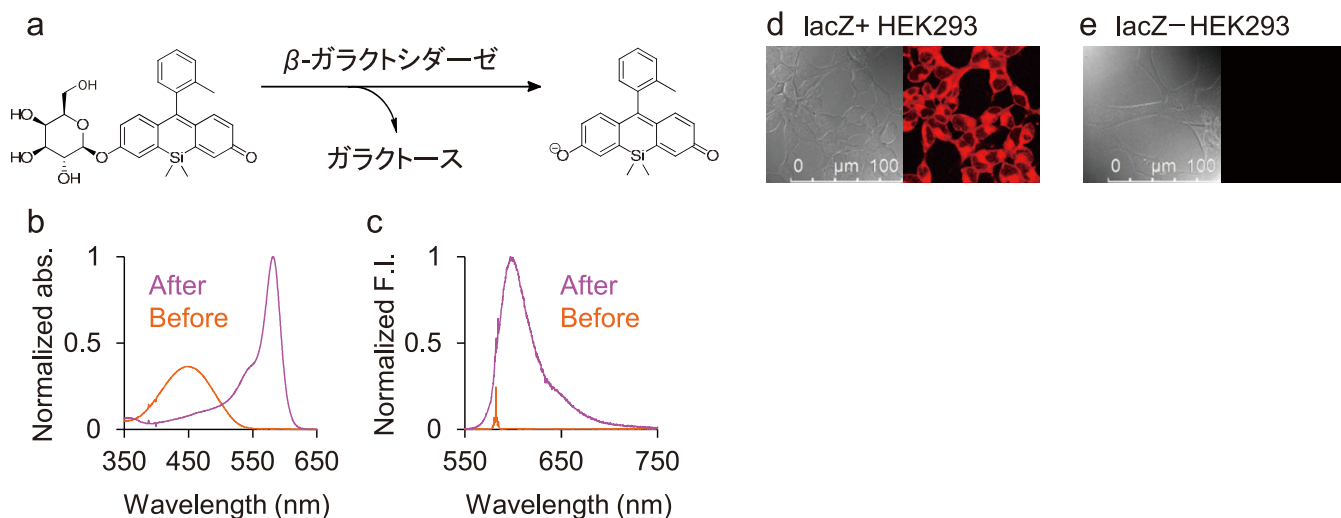


図3 (a) 2-Me TM β gal の分子構造および、 β ガラクトシダーゼとの反応。(b, c) 2-Me TM β gal の β ガラクトシダーゼとの反応前後での吸収 (b) および、蛍光 (c) (励起波長は 582 nm) スペクトル。(d, e) 2-Me TM β gal を HEK293 細胞の β ガラクトシダーゼ高発現株 lacZ+ (d) および、非発現株 lacZ- (e) にロードし、共焦点顕微鏡にて撮影した透過光像および、蛍光像。励起波長、検出波長はそれぞれ 580 nm、600–620 nm。

2.3 細胞質におけるCa²⁺をモニターする蛍光プローブの開発¹⁴⁾

カルシウムイオン (Ca²⁺) は生体の重要なセカンドメッセンジャーとして多くの生命現象に関与し、特に細胞内Ca²⁺濃度変動は様々な生体応答を惹起している。そのため、細胞内Ca²⁺濃度変動の可視化は、蛍光イメージングの分野において最も注目されている研究領域の一つとなっている。現在、緑色蛍光を有するFluo-3やFluo-4などのCa²⁺蛍光プローブが広く用いられているが、長波長を有するCa²⁺プローブは限定的な応用に留まっている。例えば、赤色蛍光を有するCa²⁺プローブで最も有名なRhod-2は、そのカチオン性のためミトコンドリアに局在しやすい特性があり、主にミトコンドリアにおけるCa²⁺イメージングに用いられているが、細胞質におけるCa²⁺の挙動解析には適していない。一方で、細胞質におけるCa²⁺はセカンドメッセンジャーとして多くのタンパク質に作用し、その濃度変動が様々な生体応答を引き起こすため、その可視化は非常に重要である。そこで本研究において、TMを用いて幅広い応用が可能な細胞質Ca²⁺をモニターできる蛍光プローブの開発を行った。Ca²⁺選択性の高いキレーター、BAPTA

(1,2-bis(*o*-aminophenoxy) ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid) 構造とTMを用いたCa²⁺プローブCaTM-1、さらに蛍光団に塩素原子を導入することでCaTM-1のCa²⁺濃度依存的な蛍光強度変化を改善したプローブCaTM-2を開発した(図4)。塩素原子導入により蛍光強度変化が改善した理由は、塩素原子が蛍光団のHOMOエネルギーレベルを低下させ、Ca²⁺非存在下において光誘起電子移動による蛍光の消光効率が高まったためと考えている。さらに、CaTM-2の細胞膜透過性体CaTM-2 AMを合成し、これを用いることでHeLa細胞におけるヒスタミン刺激による細胞質Ca²⁺濃度変動の可視化に成功した(図5a-c)。一方、Rhod-2 AMは同様の実験を行った結果、ミトコンドリアにおけるCa²⁺濃度変動を可視化した(図5d-f)。また、CaTM-2 AMの生物学研究における更なる有用性を示すため、ラット脳スライス切片へと応用した結果、神経細胞の活動を発火に伴った細胞質Ca²⁺濃度変動として捉えることに成功した(図6)。このように、皮膚の生理機能の解明研究を含めた生命科学研究に有用なCa²⁺蛍光プローブの開発に成功した。

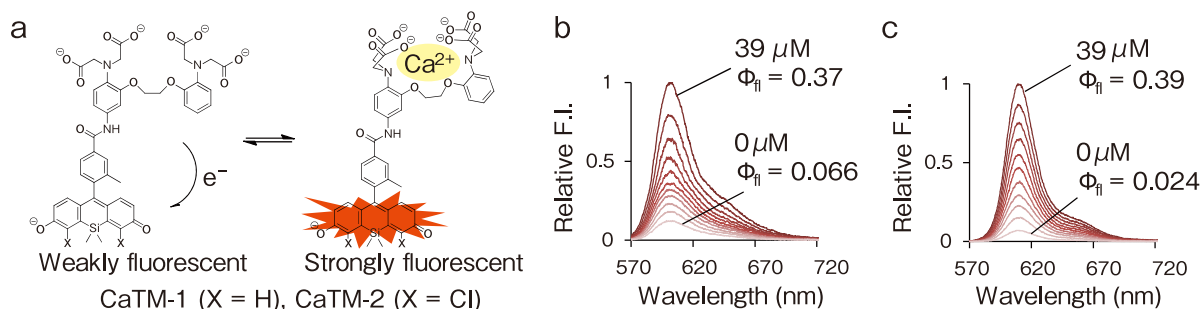


図4 (a) 新規赤色カルシウムプローブ CaTM-1 および CaTM-2 の分子構造と、Ca²⁺ が配位することによる蛍光強度変化の模式図。(b, c) CaTM-1 (b) および CaTM-2 (c) のCa²⁺ 依存的な蛍光スペクトル変化。励起波長は550 nm。

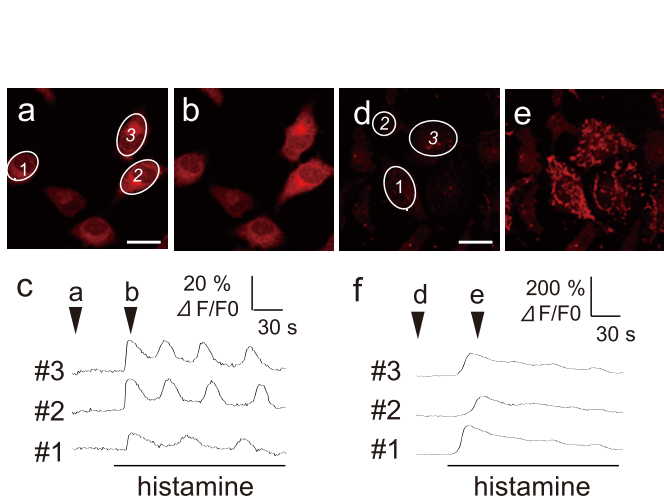


図5 (a-c) CaTM-2 AM を HeLa 細胞にロードし、ヒスタミン刺激を行った時の蛍光像 (a, b) および、蛍光強度の時間変化 (c)。(d-f) Rhod-2 AM を用いて (a-c) と同じ実験を行った結果。

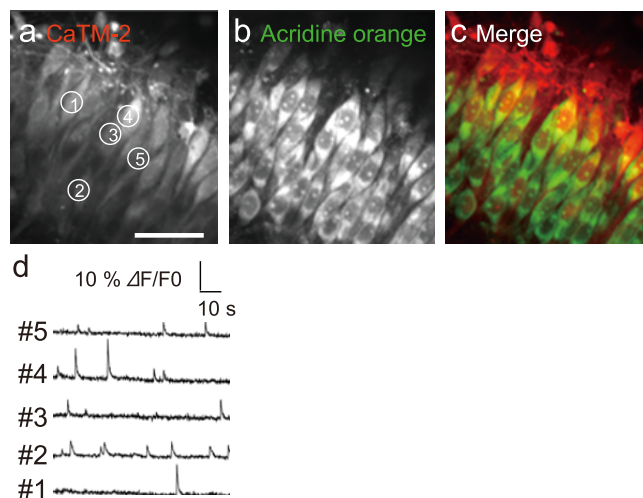


図6 CaTM-2 AM を用いたラット脳スライス切片における神経細胞の自然発火の可視化。(a-c) CaTM-2 (a)、細胞体を同定するために用いた Acridine orange の蛍光像 (b) および、重ね合わせた蛍光像 (c)。(d) CaTM-2 の蛍光強度変化。

3. 考察・総括

複数の蛍光プローブを同時に用いるマルチカラーイメージングは、複数の生体分子の同時解析や、細胞種、細胞内小器官など同定した上でのイメージングなどに有用とされる。同時に赤色領域の光は、低い自家蛍光および、高い生体組織の透過性など生体組織での蛍光イメージングに適している。また、蛍光プローブの蛍光団母核として汎用されているフルオレセインを、その分子構造の多くを保存したまま長波長化した新規赤色蛍光団TokyoMagentaは、今後、マルチカラーイメージングの可能性を大きく広げることが期待される。これまでに、 β -ガラクトシダーゼプローブ¹²⁾ および、カルシウムプローブ¹⁴⁾ の開発に成功しているが、これらの蛍光制御原理を用いることで、フルオレセインを母核とした他の緑色蛍光プローブも赤色領域にて再現できると考えている。今後、開発した赤色カルシウム蛍光プローブによって、皮膚の生理機構の解明が進展することを期待している。

(引用文献)

- 1) Egawa T, Hanaoka K, Koide Y, Ujita S, Takahashi N, Ikegaya Y, Matsuki N, Terai T, Ueno T, Komatsu T, Nagano T: Development of a far-red to near-infrared fluorescence probe for calcium ion and its application to multicolor neuronal imaging, *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 14157-14159, 2011.
- 2) Koide Y, Urano Y, Hanaoka K, Piao W, Kusakabe M, Saito N, Terai T, Okabe T, Nagano T: Development of NIR fluorescent dyes based on Si-rhodamine for in vivo imaging, *J. Am. Chem. Soc.*, 134, 5029-5031, 2012.
- 3) Kushida Y, Hanaoka K, Komatsu T, Terai T, Ueno T, Yoshida K, Uchiyama M, Nagano T: Red fluorescent scaffold for highly sensitive protease activity probes, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 22, 3908-3911, 2012.
- 4) Piao W, Tsuda S, Tanaka Y, Maeda S, Liu F, Takahashi S, Kushida Y, Komatsu T, Ueno T, Terai T, Nakazawa T, Uchiyama M, Morokuma K, Nagano T, Hanaoka K: Development of a new class of azo-based fluorescence probes to detect different levels of hypoxia, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 52, 13028-13032, 2013.
- 5) Goto M, Ikeyama K, Tsutsumi M, Denda S, Denda M: Calcium ion propagation in cultured keratinocytes and other cells in skin in response to hydraulic pressure stimulation, *J. Cell. Physiol.*, 224, 229-233, 2010.
- 6) Leiper LJ, Walczysko P, Kucerova R, Ou J, Shanley LJ, Lawson D, Forrester JV, McCaig CD, Zhao M, Collinson JM: The roles of calcium signaling and ERK1/2 phosphorylation in a Pax6^{+/-} mouse model of epithelial wound-healing delay, *BMC Biology*, 4, 27, 2006.
- 7) Denda M, Denda S: Air-exposed keratinocytes exhibited intracellular calcium oscillation, *Skin Res. Technol.*, 13, 195-201, 2007.
- 8) Kao JPY, Harootunian AT, Tsien RY: Photochemically generated cytosolic calcium pulses and their detection by fluo-3, *J. Biol. Chem.*, 264, 8179-8184, 1989.
- 9) Johnson I, Spence MTZ, Ed., *The Molecular Probes® Handbook: A guide to fluorescent probes and labeling technologies* 11th Ed., Molecular Probes, Inc., 2010.
- 10) Yamaguchi S, Tamao K: Silole-containing σ - and π -conjugated compounds, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 3693-3702, 1998.
- 11) Fu M, Xiao Y, Qian X, Zhao D, Xu Y: A design concept of long-wavelength fluorescent analogs of rhodamine dyes: replacement of oxygen with silicon atom, *Chem. Commun.*, 1780-1782, 2008.
- 12) Egawa T, Koide Y, Hanaoka K, Komatsu T, Terai T, Nagano T: Development of a fluorescein analogue, TokyoMagenta, as a novel scaffold for fluorescence probes in red region, *Chem. Commun.*, 47, 4162-4164, 2011.
- 13) 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.*, 127, 4888-4894, 2005.
- 14) Egawa T, Hirabayashi K, Koide Y, Kobayashi C, Takahashi N, Mineno T, Terai T, Ueno T, Komatsu T, Ikegaya Y, Matsuki N, Nagano T, Hanaoka K: Red fluorescence probe for monitoring dynamics of cytoplasmic calcium ion, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 52, 3874-3877, 2013.