

リソソーム内 pH を定量可能な蛍光プローブの開発

慶應義塾大学薬学部・大学院薬学研究科創薬分析化学講座
花岡 健二郎

【背景・目的】

蛍光イメージング法において、「生体の光の窓」と呼ばれる650 nmから900 nmの近赤外光領域の波長領域の光は、動物個体でのイメージングやマルチカラーイメージングに有用である。波長650 nm以下の可視光領域の光は主にヘモグロビンによって、900 nm以上の光は水によって吸収が大きくなるが、この中間の650 nmから900 nmの近赤外光領域の光は、生体組織の構成物質による光の吸収は少なく組織透過性が高い。また、マルチカラーイメージングにおいては、新たなカラーウィンドウとして、そのニーズは極めて高い。

筆者らはこれまでに新たな近赤外蛍光団であるSiR類の開発に成功している(図1) [1, 2]。さらに近年では、左右対称型のSiR類に留まらず、新たに左右非対称型のSiR類の合成法の確立に成功している(図2) [3]。本研究では、この非対称型のSiR類の更なる開拓と、それを基盤としたリソソーム内pHを定量可能な蛍光プローブの開発を行ったので、その詳細を以下に記す。

【方法・結果】

1. DPP-4 (dipeptidyl peptidase 4) プローブの開発

初期検討によって、非対称SiR類のキサンテン環上のN原子をアミド化することで110 nm以上の大きな吸収波長の短波長化を引き起こすことを見出し、これを利用することでアミド結合の切断に伴う大きな蛍光増大を起こすことができると考えた[4]。異なるDPP-4の認識配列を結合させたプローブを合成し、それらの機能評価を行った結果、何れのプローブも精製酵素と速やかに反応し、更に培養細胞を用いた蛍光イメージングにおいてもDPP-4高発現細胞でのみ蛍光増大を示し、阻害剤の添加によってその蛍光上昇は抑制された。開発したプローブの中でもEP-SiR640が最も大きな蛍光上昇比を示し(図3)、また生体内に存在する様々なプロリルペプチダーゼの中でもDPP-4と選択的に反応することが分かった。さらに、開発した蛍光プローブの動物個体への応用を行った。マウスを開腹した後にEP-SiR640を静脈内投与し、腹腔内の臓器からの蛍光を観察した。その結果、腎臓や腸管から蛍光増大が確認され、阻害剤の投与によってその蛍光増大は抑制されたことから、内在性のDPP-4活性を検出可能であることが分かった。次に、H226細胞で作製した担がんモデルマウスにEP-SiR640

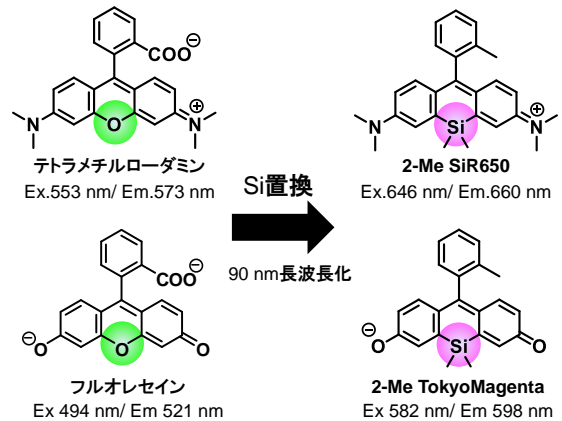
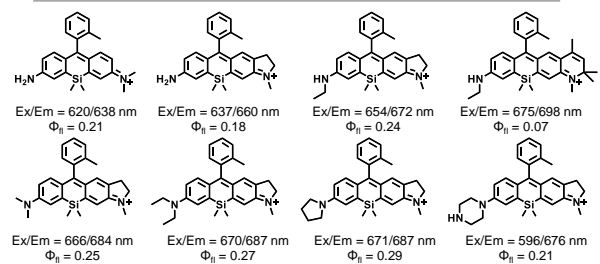
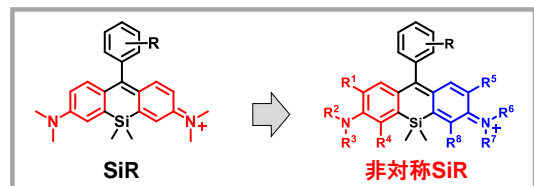


図1. 筆者らが開発した Si 置換フルオレセイン類(TokyoMagenta 類) 及び Si 置換ローダミン類 (SiR 類)。



Measured in 100 mM NaPi buffer (pH 7.4) containing 1% DMSO.

図2. 筆者らが近年合成法を確立した非対称 SiR 類。

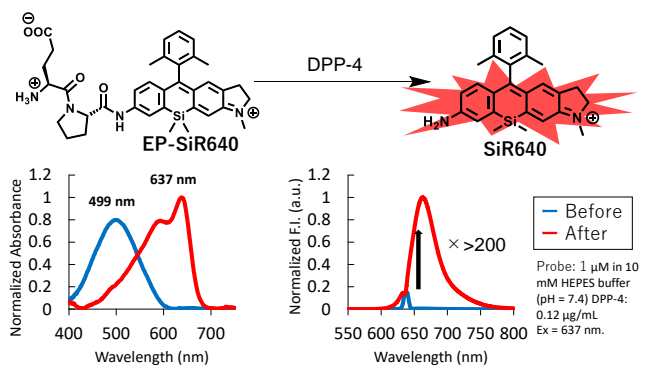


図3. 開発した DPP4 活性検出蛍光プローブとその吸収・蛍光スペクトル変化。

を腫瘍内投与し、蛍光観察を行った。プローブ投与直後から腫瘍内において強い蛍光が観察され、DPP-4阻害剤によりその蛍光は抑制された。このように、担がんモデルマウスにおいてDPP-4活性を指標としたがん蛍光イメージングを行うことに成功した。

次に、国立がん研究センターの安永正浩先生らとの共同研究によって、開発した蛍光プローブを食道がん内視鏡生検サンプルへと応用した。具体的には、食道がん患者由来の内視鏡検体を薄切した組織をスライドガラスに載せ、DPP-4阻害剤を含まない、或いは含んだHBSS中で30分間インキュベーションした後にEP-SiR640及び核染色のためのDAPIを含んだHBSSに置換し、50分間インキュベーションした後に蛍光イメージャーにて蛍光観察を行った。その結果、内視鏡生検サンプルから蛍光増大が観察され、DPP-4阻害剤の添加によってその蛍光増大は抑制された(図4)。ヘマトキシリン・エオジン染色(HE染色)によって、いずれの検体も腫瘍部位であることが確認された。

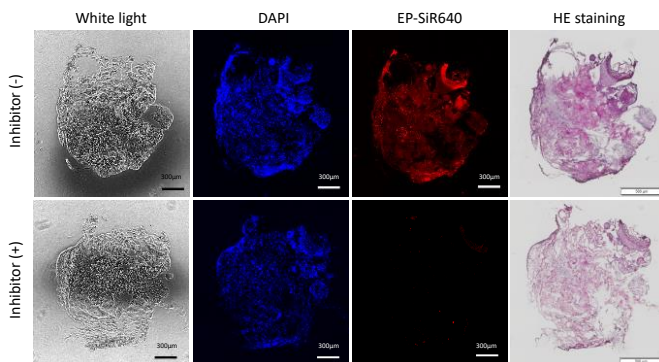


図4. 食道がん生検サンプルの組織切片の蛍光プローブによる染色。Ex. 620/60 nm; Em. 700/75 nm。

最後に、東京大学医学部付属病院胃食道外科の瀬戸泰之教授、坂本啓先生との共同研究によって、開発した蛍光プローブの食道がんESD検体への応用を行った。具体的には、ESDによって切除した食道がん新鮮手術検体にEP-SiR640を散布し、蛍光観察を行った。蛍光プローブを散布する前はESD検体からの自家蛍光は観察されなかったが、蛍光プローブの散布によって時間経過に伴い蛍光増大が観察され、散布5分後以内に蛍光像の境界が明瞭になった。ルゴール染色、また病理診断によって腫瘍部位を同定したところ、正常部位と腫瘍部位の境界は蛍光画像とよく一致した。

2. HaloTagタンパク質との結合により発蛍光する近赤外蛍光プローブの開発

図5に示すキサンテン環のN原子にフェニル基が結合した非対称型SiR類は、溶媒の粘度の上昇に伴う蛍光増大が観察された。これは励起状態での芳香環が結合したN原子近傍の回転による無輻射の失活が、溶媒の粘度の上昇によって抑制され、蛍光性へと変化したためと考えた。そこで、標的タンパク質との結合時にのみ、N原子近傍の回転が抑制され、蛍光性へと変化する新たな蛍光制御法が開発可能であると考えた[5]。標的分子としては、タグタンパク質として汎用されているHaloTagタンパク質に着目し、HaloTagタンパク質との結合時にのみ蛍光が増大するプローブの開発を行った(図5)。具体的には、芳香環が結合したN原子の近傍にHaloTagリガンドを結合させたプローブ群をデザイン・合成した結果、HaloTagリガンドがキサンテン環の3位のN原子に直接結合しているプローブが、HaloTagタンパク質との結合により大きな蛍光増大を示すことが分かった。さらに、複数のスルホ基を修飾し、他のタンパク質との非特異的な結合による蛍光上昇を抑制することで、HaloTagタンパク質選択的に蛍光増大を示すHalo SiR-4の開発に成功した。実際に細胞膜上に発現したHaloTagタンパク質融合GPCRへと本プローブを応用したところ、プローブ添加後15分以内に、洗浄操作を必要とせず、HaloTagタンパク質の発現細胞選択的に細胞表面の蛍光上昇が観察された(図6)。

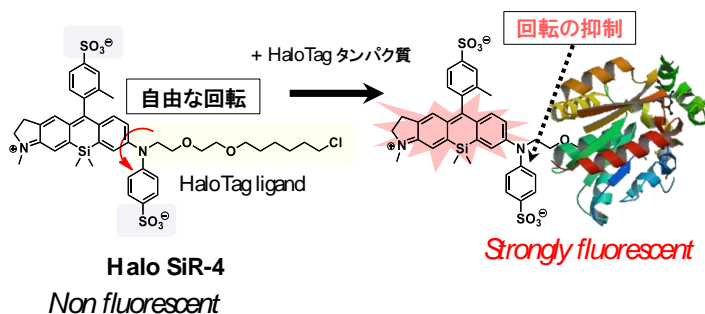


図5. 開発した HaloTag タンパク質に結合することで発蛍光する蛍光プローブ。

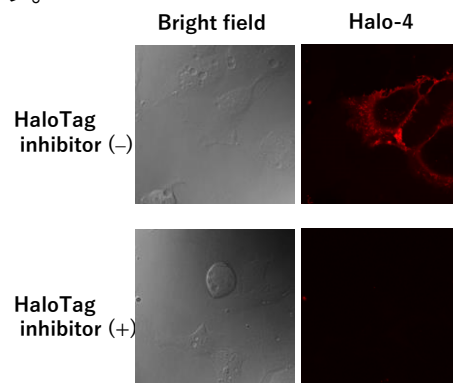


図6. 開発した HaloTag プローブを用いた Halo-B2R を細胞膜上に発現させた生細胞での蛍光イメージング。Ex. 624 nm。

3. レシオ型pH蛍光プローブの開発

細胞内の各オルガネラは固有のpHを持つことで種々の化学反応を制御している。そのため、オルガネラ固有のpHを測定することは細胞内で起きている生命現象の理解のために極めて重要である。そこで、

特定のオルガネラのpHを定量可能な新たな蛍光プローブの開発を行った。

様々な置換基を有する非対称SiRの光学特性を精査したところ、ピペラジン環を有する非対称SiRはピペラジン環の脂肪族アミノ基がプロトン化されることで、蛍光性を保ったまま吸収波長が約80 nmもの大きな短波長化を示すことを見出した。これまでにpH変化に応じて大きな吸収波長変化を示すローダミン系蛍光色素の報告はなく、本分子はローダミン類の特徴である高い光褪色耐性を持った有用なpH感受性プローブの色素母核となりうると考えた。そこで、本色素母核を用いて、異なる二波長で励起した際の蛍光強度比(レシオ)の変化を測定することで細胞内の酸性pHを定量的に測定可能な二波長励起一波長測光用のレシオ型pHプローブの開発を行った(図7a,b) [6]。開発した蛍光プローブのレシオ値は $pK_a = 6.1$ と弱酸性オルガネラのpHを測定するために適しており(図7c)、また既存のレシオ型pH蛍光プローブである

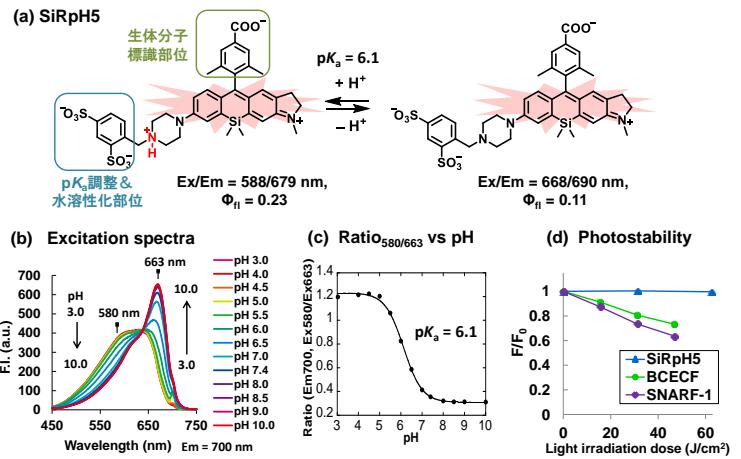


図7. これまでに筆者らにより開発されたレシオ型pH蛍光プローブ。(a) 開発したpH蛍光プローブ(SiRpH5)の分子構造。(b) 励起スペクトルのpH依存性。(c) pH変化に伴う蛍光強度のレシオ値の変化。(d) 光照射による蛍光強度変化について、既存のレシオ型pH蛍光プローブとの比較。

BCECFやSNARF-1と比較して、高い光褪色耐性を示すことが分かった(図7d)。デキストラン(Dex)は、細胞内にエンドサイトーシスされることで酸性オルガネラであるリソソームに集積することが知られている。そこで、リソソーム内pHの測定プローブとして、SiRpH5をデキストランに結合させたSiRpH5-Dexを作成し、本プローブをMEF細胞の外液に添加し、580 nmと660 nmの二波長で励起してレシオイメージングを行った。固定細胞を用いてpHの検量線を作成し、観測されたレシオ値を基にpHの定量を行ったところ、リソソーム塩基性化試薬である NH_4Cl の添加に伴い、リソソームのpHが約4.7から約6.2まで塩基性化する様子を可視化することに成功した。

しかし一方で、SiRpH5は励起波長が汎用されているレーザー光に適合せず汎用性が低いことや、蛍光プローブのエンドソームへの送達しか達成できていなかった。そこで本研究では、SiRpH類の蛍光団母核や分子構造を改良することで、これらを克服した汎用性の高いレシオ型pHプローブの開発を行った。SiRpH類の励起波長を20-30 nm短波長化するために、蛍光団母核をC-rhodamine (CR)類に代えたCRpH2を分子設計・合成し、その光学特性を調べた(図8a)。その結果、吸収波長の短波長化に成功し、汎用されているレーザー波長の561 nmと633 nmに最適であった。また、異なる二波長で励起した際のレシオ値の

変化は、 $pK_a = 5.5$ と算出され、弱酸性オルガネラのpH測定に適していた。次に開発したCRpH2を酸性オルガネラであるリソソームへと送達するため、デキストランにCRpH2を標識し、CRpH2-Dexを作成した。

そして、リソソームのマーカータンパク質であるTmem192(EGFP融合)を安定発現させたMEF細胞にCRpH2-Dexを導入し、生細胞イメージングを行った。その結果、マーカータンパク質とプローブの蛍光が高い重なりを示し、リソソーム内の平均pHは 5.1 ± 0.1 であった(図8b)。

次に、リソソーム以外のpH定量を試みた。リソソーム以外のオルガネラの多くはpHを中性付近に有するため、新たに $pK_a = 6.5$ である2COOH CRpH4を開発し、様々なオルガネラへと送達するために、HaloTagリガンドを結合させた2COOH CRpH4 Haloを開発した(図9a)。また、ミトコンドリアのマトリックス領域に局在するタンパク質であるSu9、内膜と外膜間に局在するタンパク質であるOPA1にそれぞれHaloTagを融合させて安定発現したMEF細胞に2COOH CRpH4 Haloを導入し、生細胞イメージングを行った。蛍光イメージングからpH定量を行った結果、マトリックス領域の平均pHが7.5以上(図9b)、膜間腔の平均pHが 7.2 ± 0.1 となり(図9c)、ミトコンドリアのマトリックス内と膜間腔のpHの違いを測定することに成功した。

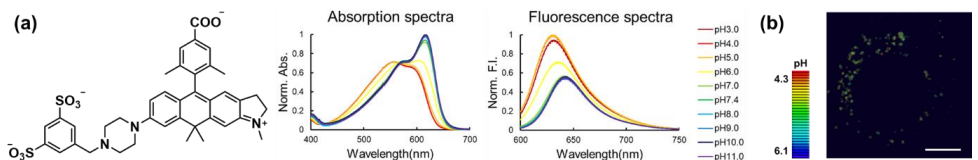


図8. 新たに開発したレシオ型pH蛍光プローブCRpH2。(a) CRpH2の分子構造と吸収・蛍光スペクトルのpH依存的な変化。(b) CRpH2-Dexを用いたリソソーム内pHのレシオ蛍光イメージング。Scale Bar: 10 μm 。

本研究において、CR 類を蛍光色素母核として用いることで、既存のレーザー波長に適した新たなレシオ型 pH プロブ類の開発に成功した。また、本プロブ類は、ピペラジン環部位の構造修飾によって容易に pK_a を制御可能であった。さらに、デキストランや HaloTag テクノロジーを利用することで、リソソームやミトコンドリア内の pH 及び pH 変化の蛍光イメージングに成功した。その他、初期エンドソーム、後期エンドソーム、核、ER、ゴルジ体、ペルオキシソームなど様々なオルガネラ内の pH の定量にも成功している。

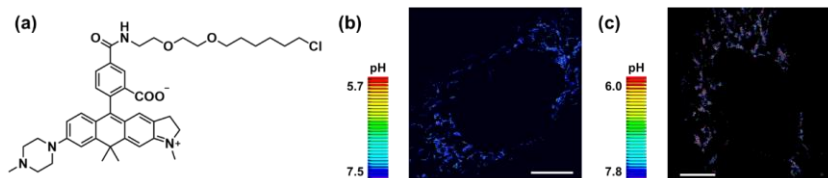


図 9. HaloTag システムを用いたレシオ型 pH 蛍光プロブ 2COOH CRpH4 Halo。 (a) 2COOH CRpH4 Halo の分子構造。 (b) Su9-Halo を安定発現した MEF 細胞でのミトコンドリアのマトリックス内 pH のレシオ蛍光イメージング。 (c) OPA1-Halo を安定発現した MEF 細胞でのミトコンドリアの膜間腔 pH のレシオ蛍光イメージング。

【まとめ】

本研究において、筆者らが独自に開発した非対称 SiR 類を基盤として、様々な近赤外蛍光プロブの開発に取り組んだ。例えば、酵素基質となるアミノ酸残基の切断に伴う 110 nm 以上もの大きな吸収波長の変化を利用した DPP4 活性検出蛍光プロブや、分子内回転の制御による HaloTag タンパク質を検出する発蛍光プロブの開発に成功した。さらに、これら蛍光プロブの開発により得られた技術を基にして、細胞内 pH を定量可能な、汎用性の高いレシオ型蛍光プロブの開発に成功し、デキストランや HaloTag システムを組み合わせることで、様々な細胞内オルガネラの pH を測定可能な新たな蛍光プロブの開発に成功した。今後は、開発したプロブ群を様々な疾患細胞へと応用し、疾患と pH の関係を明らかにしていく。

[参考文献]

- 1) Yu Kushida, Tetsuo Nagano, Kenjiro Hanaoka, *Analyst* 140, 685-695 (2015).
- 2) Takayuki Ikeno, Tetsuo Nagano, Kenjiro Hanaoka, *Chem. Asian J.* 12, 1435-1446 (2017).
- 3) Kenjiro Hanaoka, Yu Kagami, Wen Piao, Takuya Myochin, Koji Numasawa, Yugo Kuriki, Takayuki Ikeno, Tasuku Ueno, Toru Komatsu, Takuya Terai, Tetsuo Nagano, Yasuteru Urano, *Chem. Commun.* 54, 6939-6942 (2018).
- 4) Yuki Hoshino, Kenjiro Hanaoka, Kei Sakamoto, Masahiro Yasunaga, Takashi Kojima, Daisuke Kotani, Ayumu Nomoto, Eita Sasaki, Toru Komatsu, Tasuku Ueno, Hiroyuki Takamaru, Yutaka Saito, Yasuyuki Seto, Yasuteru Urano, *RCS Chem. Biol.* 3, 859-867 (2022).
- 5) Kenjiro Hanaoka, Shimpei Iwaki, Kiyoshi Yagi, Takuya Myochin, Takayuki Ikeno, Hisashi Ohno, Eita Sasaki, Toru Komatsu, Tasuku Ueno, Motokazu Uchigashima, Takayasu Mikuni, Kazuki Tainaka, Shinya Tahara, Satoshi Takeuchi, Tahei Tahara, Masanobu Uchiyama, Tetsuo Nagano, Yasuteru Urano, *J. Am. Chem. Soc.* 144, 19778-19790 (2022).
- 6) Shodai Takahashi, Yu Kagami, Kenjiro Hanaoka, Takuya Terai, Toru Komatsu, Tasuku Ueno, Masanobu Uchiyama, Ikuko Koyama-Honda, Noboru Mizushima, Tomohiko Taguchi, Hiroyuki Arai, Tetsuo Nagano, Yasuteru Urano, *J. Am. Chem. Soc.* 140, 5925-5933 (2018).