

光でみる生体内分子動態

菊地和也

Visualization of Biological Compounds Using Fluorescent Sensor Molecules

Kazuya KIKUCHI

One of the great challenges in the post-genome era is to clarify the biological significance of intracellular molecules directly in living cells. If we can visualize a molecule in action, it is possible to acquire biological information, which is unavailable if we deal with cell homogenates. One possible approach is to design and synthesize sensor molecules that can convert biological information to chemical reactions that are easily monitored. For this purpose, fluorescence sensor molecules for intracellular messengers have been developed and successfully applied to living cells. Ratiometric measurement is a technique to reduce artifacts by minimizing the influence of extraneous factors on the fluorescence of a sensor molecule. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) is one mechanism that is applicable for ratiometric measurement. We have designed two FRET sensor molecules, based on changing donor-acceptor distance and changing overlap integral. Protein tyrosine phosphatase activity was successfully monitored by designed sensor.

Key words: fluorescence imaging, fluorescent sensor molecule, ratiometric imaging, fluorescence resonance energy transfer

生化学の発展とゲノム解読の進行により、細胞内での情報伝達物質やその物質を認識する分子が次々に同定され、試験管内での性質が明らかにされるようになった。現在ではポストゲノムという言葉が汎用されるが、この時代には、次の目標である生理的条件下での機能の解明が重要視されるようになってきている。このためには、細胞をすりつぶさずに、生きたまま機能を調べることができれば、多くの情報が得られると考えられる。この目的のため、細胞内分子と特異的に反応して蛍光特性が変化するセンサー分子をデザイン・合成し、細胞に直接応用することを試みた。この結果、生体情報を読み取り可能な光情報に置き換えることで、生体内分子の空間的・時間的な変化を解析する手法を創り出すことが可能となる。本稿では成功例として、蛍光共鳴エネルギー移動 (fluorescence resonance energy transfer: FRET) を応用したチロシンホスファターゼセンサー分子について紹介する。

1. FRET 型蛍光センサー分子の開発

1.1 レシオ測定の重要性

蛍光センサー分子を用いて可視化解析を行う際の最大の利点は高感度である点である。しかし、実際に生物応用を行う際には、この高感度のため測定誤差が生じやすいという問題点があげられる。細胞に応用する際には、蛍光センサー分子周囲の環境の変化 (pH, 極性の変化, 温度など)、細胞の厚さによる強度変化、センサー分子の局在による濃度の違いなどの影響を受けて測定誤差を生じる。これらの要因による測定誤差を減少し、定量性の高い測定法として、レシオ測定 (ratiometric measurement) が報告されている¹⁾。レシオ測定とは、蛍光スペクトルまたは励起スペクトルにおいて、異なる2波長での蛍光強度を同時に測定し、その比 (レシオ) を計算する手法である。レシオ測定を可能とするためには、測定対象分子との反応あるいは分子認識によって励起光波長あるいは蛍光波長が変化するセンサ

一分子が必要となる。このため、蛍光共鳴エネルギー移動 (fluorescence resonance energy transfer: FRET) の効率変化によって、蛍光・励起波長が変化するセンサー分子を作製した。FRET を利用したセンサー分子としてはじめて報告されたものは、cAMP センサー分子である FICRhR (フリッカー) である²⁾。FICRhR は、cAMP 依存性タンパク質リン酸化酵素のユニットに蛍光ラベルを導入し、cAMP 結合により複合体が解離することで分子間の距離を変化させることを原理としている。その後 1994 年以降は、グリーン蛍光タンパク質 (green fluorescent protein: GFP) の生物応用³⁾ が盛んになり、1997 年に Ca²⁺ 結合によるタンパク質のコンフォメーション変化を FRET 効率変化に変換できる cameleon が報告され⁴⁾、これ以降 GFP を用いた FRET センサーが多く報告されている。

FRET とは、ドナーである蛍光色素を励起したとき、励起エネルギーが近傍に存在するアクセプター分子に移動する現象である。アクセプターが蛍光分子であれば、アクセプターからの蛍光が観測される。FRET は分光学定規 (optical ruler) とよばれ、FRET 効率はドナー分子とアクセプター分子の距離を反映する。この現象は、1970 年前後に、プロリンを用いたペプチド鎖に蛍光色素を 2 つ導入することで実証された⁵⁾。

1.2 FRET の原理

まず、FRET の原理について紹介し、デザインをする際の着目点について説明したい。FRET とは、ドナーの蛍光団と特定の条件を満たすアクセプターの蛍光団が近傍にある場合、ドナーを励起すると一重項状態のエネルギーがアクセプターに移動し、アクセプターが励起される現象である。FRET 過程はドナー自身の発光遷移、無放射遷移と競合するので、それぞれの速度定数を k_f , k_t , k_{nr} とすると、FRET のエネルギー移動の効率 E_T は式 (1) で表される。

$$E_T = k_f / (k_f + k_t + k_{nr}) \quad (1)$$

つまり、励起エネルギー移動速度が、発光遷移速度、無放射遷移速度よりも速ければ、FRET 効率も大きくなる。この場合のエネルギー移動は、分子間の接触を必要としない比較的長距離で起こる。このような空間を介して起こるエネルギー移動は、次に示すフェルスターの関係式 (2) に従い、移動速度定数 k_f が成り立つ⁶⁾。

$$k_f = \{9000 (\ln 10) \kappa^2 J / 128 \pi^5 n^4 N_A r^6\} k_t \quad (2)$$

(n は溶媒の屈折率, N_A はアボガドロ数)

FRET の起こりやすさは k_f の大きさに依存するが、分子デザインを行う際、以下の 3 つの因子 (κ^2 , J , r) を変

化させることで k_f を変化させ、センサー分子の波長変化をもくろむことができる⁷⁾。

① κ^2 : 配向因子 (orientation factor)。ドナーとアクセプターのモーメントの相対的な向きを表す。0~4 に値をとり、両モーメントが直交している場合には 0、平行の場合は 4 の値をとる。合成小分子を用いた場合は、両モーメントが自由回転していると考え 3 分の 2 に近似している。現在までに、 κ^2 を変化させうるセンサー分子は報告されていない。

② J : 重なり積分 (overlap integral)。ドナーの蛍光スペクトルとアクセプターの吸収スペクトルの重なりを示し、 J の値に k_f は比例する。アクセプター分子の量子収率によって影響されないため、重なり積分のみ存在すればエネルギーは移動する。つまり、光らないアクセプターへのエネルギー移動も起こりうる。ドナーとアクセプターの組み合わせによって変化する値である。

③ r : ドナーとアクセプター間の距離。 k_f は $1/r^6$ に比例する。よって、距離が大きくなると k_f は小さくなる。この変化をもとに波長変化をもくろんだセンサー分子が最も多く報告されている。

以下に、 r と J を変化させることでセンサーデザインを行った例を紹介する。

1.3 距離変化型 FRET センサー分子

本研究では、最初に距離変化型の FRET センサー分子をデザイン・合成した。50% の FRET 効率を与える距離はフェルスター半径 (R_0) とよばれ、ドナー・アクセプターの組み合わせ (重なり積分) によって決まる値である。ドナー・アクセプター間距離 r と E_T の間には (3) の関係式が成り立つ。

$$E_T = R_0^6 / (r^6 + R_0^6) \quad (3)$$

この R_0 は、通常の小分子ペアでは 5~10 nm 程度となる。この R_0 を超えて距離変化が起これば E_T が変化し、測定蛍光波長が変化するはずである。

当初、細胞がアポトーシスを起こすときに活性化される Caspase 3 活性を可視化しようと研究を開始した。この場合、基質となる特異的アミノ酸配列の両端にドナーとアクセプターを導入した。しかし、単純にペプチド鎖の両端に 2 つの色素を導入した場合、水溶液中では消光する。同じセンサー分子をメタノールなどの有機溶媒に溶かした場合は FRET が観測される⁷⁾。蛍光色素は一般に疎水的な構造を有しているため、水溶液中では基底状態で無蛍光性の会合体を形成することが報告されている⁸⁾。しかし、プローブとして細胞や生体組織で応用するためには、水溶液中で機能

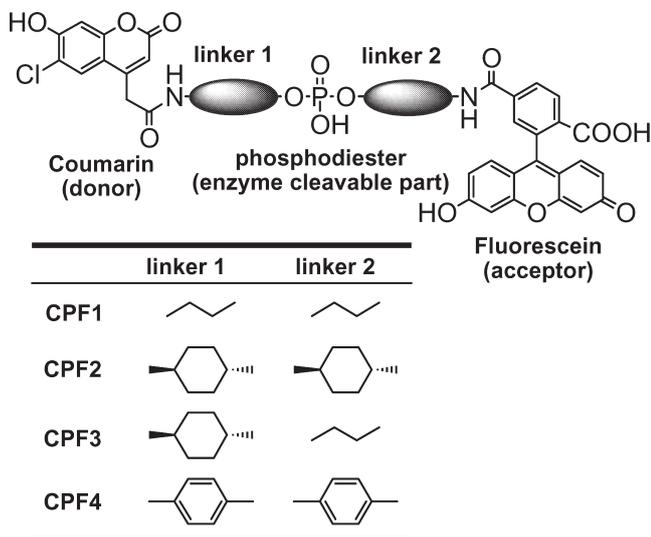


図1 CPF 類の構造式。

しなければならぬ⁹⁾。このため、以降の研究では、水溶液中での色素会合を妨げることをねらって分子デザインを行った。

分子会合由来の消光を防ぐために、一方の蛍光団をホスト分子で囲むことで会合を妨げるデザインを行った。ドナーにクマリン、アクセプターにフルオレセインを選び、フレキシブルなリンカーでつなぐと、蛍光が観測されなかった。その溶液にβ-シクロデキストリン(β-CD)を加えたところ、アクセプター蛍光の上昇が観測された¹⁰⁾。さらに、分子内にクマリン・フルオレセインとクマリンを包接するようにβ-CDを結合させた化合物を合成し、FRET由来の蛍光を確認した。この結果より、水中における会合を阻害することで、エネルギー移動が確認できることが示された。しかし、β-CDなどの大きい分子で修飾を行った場合、細胞内導入効率が低下するなどの生物応用への問題点が生じる。そこで、ドナーとアクセプターをつなぐリンカー部分を非会合性にデザインすることとした。

測定ターゲットとして、リン酸ジエステル結合の加水分解を触媒するホスホジエステラーゼを選択した。分子デザインとしては、酵素活性によって加水分解されるリン酸ジエステル構造の両端に、リンカーを介してクマリンとフルオレセインを導入した。2つの蛍光団の R_0 は4.8 nmと算出され、ドナーとアクセプターが分子内に存在する場合は(以降紹介する CPF 類の場合、ドナー・アクセプター間距離は3 nm 以下) 高効率でFRETが起こり、アクセプター蛍光が測定されると予想される。リンカーとしては、フレキシブルなエチレンとリジッドなシクロヘキサンを選択し組み合わせて分子デザインを行い、CPF (coumarin-phosphate-fluorescein) 類と命名した(図1)。エチレン鎖

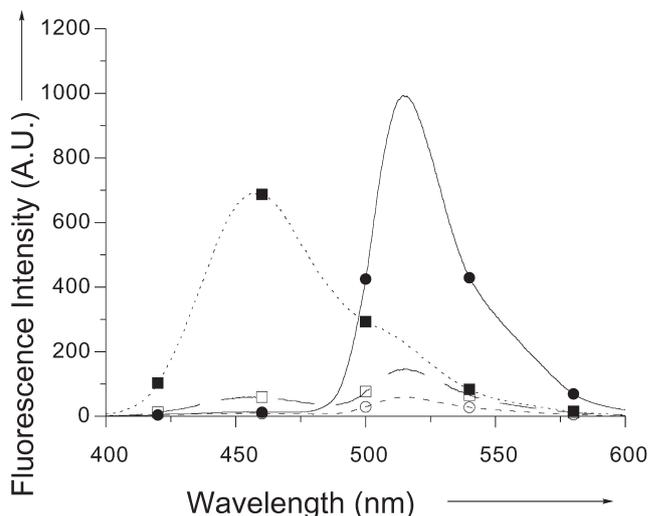


図2 CPF 類の水溶液の蛍光スペクトル。○ CPF1, ● CPF2, □ CPF3, ■ コントロール(クマリンとフルオレセインを混ぜたもの)。

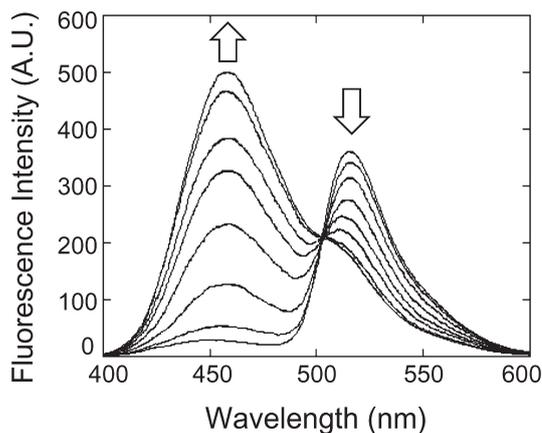


図3 酵素活性による CPF の蛍光スペクトル変化。

2つをリンカーとして用いた CPF1 は水中でほとんど蛍光性を示さなかったが、シクロヘキサン構造を2つ導入した CPF2 では、FRET 由来のフルオレセインの蛍光が観測された(図2)¹¹⁾。この理由は、シクロヘキサン構造はリジッドな構造をとるために、分子全体の自由度が下がり、ドナーとアクセプターが会合できないためであると考えられる。リンカーにエチレン鎖とシクロヘキサン構造をそれぞれ1つずつ有する CPF3 では、CPF1 と同様に会合による消光が起こっていた。また、コントロールとして酵素反応による切断後を想定し、クマリンとフルオレセインを混ぜた溶液では、FRET は起こらずドナーの蛍光が観測された(図2)。さらに、酵素反応に最適なリンカーを選択し、リン酸ジエステル近傍の立体障害がシクロヘキサンよりも小さいフェニル基を2つリンカーとした CPF4 が最適であることが示された。CPF4 をクマリンの励起波長 370 nm で

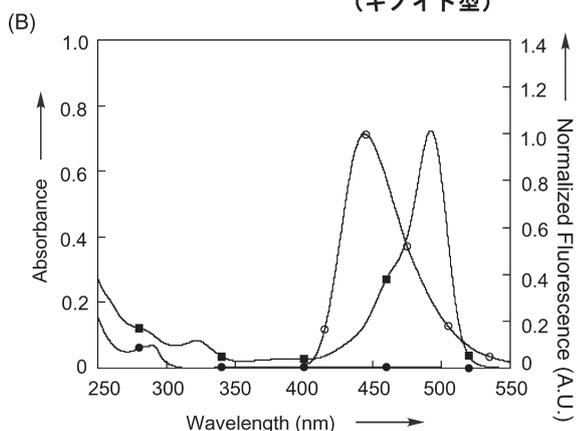
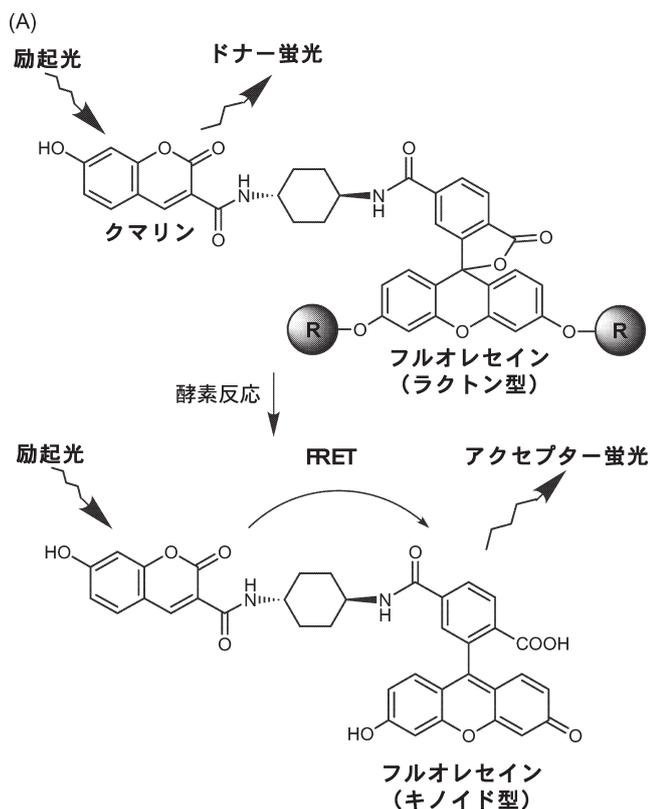


図4 (A) 酵素反応によるラクトン型からキノイド型への変化。Rは酵素によって加水分解を受ける基質構造を表す。(B) クマリン蛍光スペクトルとフルオレセイン吸収スペクトルの重なり積分の変化。○クマリンの蛍光スペクトル、●ラクトン型フルオレセインの吸収スペクトル、■キノイド型フルオレセインの吸収スペクトル。

励起すると、515 nm 付近に FRET 由来の強いアクセプター蛍光を示した。ホスホジエステラーゼを添加すると、時間経過とともに 515 nm のアクセプター蛍光が減少して、450 nm 付近のドナー蛍光が増大した (図3)¹²⁾。この蛍光波長の変化は、先に述べたレシオ測定を可能とする。

1.4 重なり積分変化型 FRET センサー分子

次に、標的酵素との反応によって重なり積分が変化する FRET センサーのデザインを行った。フルオレセインはラクトン型とキノイド型の2つのコンフォメーションをと

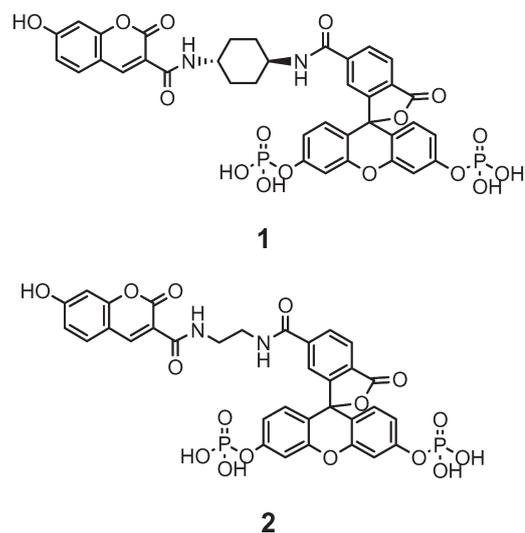


図5 PTP 蛍光センサー分子化合物 1, 2 の構造式。

り、それぞれが大きく異なる吸収スペクトルを示すことが知られている。この性質を利用して、重なり積分をスイッチとしたセンサー分子をデザインした (図4)。キノイド型のフルオレセインは 490 nm 付近に強い吸収ピークを示すが、ラクトン型フルオレセインの吸収は UV 領域のみである。クマリンをドナーとした場合、キノイド型は大きな重なり積分をもつのにに対し、ラクトン型ではスペクトルの重なりは存在しない。したがって、水酸基に置換基を導入してラクトン型となったフルオレセインとクマリンを分子内に導入した場合、スペクトルの重なりがないためにエネルギー移動は起こらない。このため、クマリンの励起エネルギーは、そのままクマリンの蛍光として観測される。このセンサー分子が標的酵素の基質となり置換基が加水分解を受けると、フルオレセインがキノイド型に変換されて FRET が起こり、ドナーを励起することでアクセプター蛍光が検出されるようになる。この検出原理を使って、タンパク質チロシンホスファターゼ (PTP) 活性によって波長変化するセンサー分子をデザイン・合成した。

PTP はリン酸化チロシンの脱リン酸化を行う酵素であり、チロシンキナーゼによってリン酸化されたチロシン残基をもとの状態に戻し、タンパク質リン酸化によって行われる細胞内シグナル伝達を調節する重要な酵素である。PTP はインスリンシグナル伝達、細胞の分化・成長、神経系など生理過程において重要な役割を果たしている。しかし、これらの作用は、細胞をすりつぶして得られた PTP の活性をもとに細胞内での作用を示したものであり、生細胞内での作用を直接示したものではない。さらに、細胞増殖時など、細胞が生きた状態での活性が重要視される状態には対応できなかった。このため、PTP 活性をイメージング

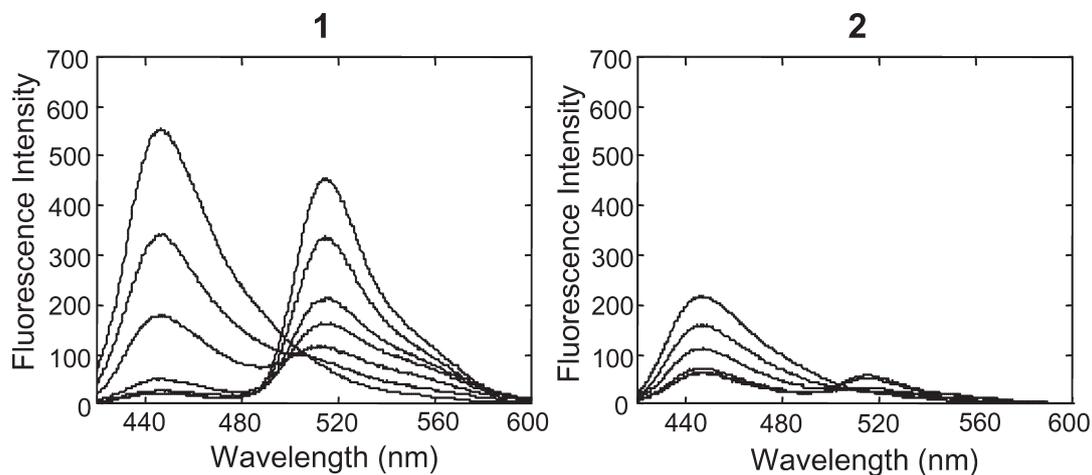


図6 PTP センサー分子の PTP 活性によるスペクトル変化.

できるセンサー分子によって、従来調べることができなかった PTP の機能が明らかになる可能性がある。また、チロシンキナーゼ活性に対しては GFP を用いたセンサータンパク質が報告されているが、PTP 活性をモニターする有効な手段は報告されていない。この状況下、生きた状態での PTP 活性を可視化することで新たな生物学現象が明らかになるのではないかと考え、センサー分子のデザイン・合成・生物応用に着手した。

PTP 蛍光センサー分子として、2つのリン酸基を導入したラクトン型フルオレセインを、リンカーを介してクマリンと結合させた化合物 1 をデザインした (図 5)。リンカーには、色素の会合によって消光しないようにシクロヘキサン構造が選択されている。水溶液中で化合物 1 をドナーの励起波長 400 nm で励起したところ、450 nm 付近のドナー蛍光を示した。PTP の一種である PTP1B を添加すると、450 nm 付近のドナー蛍光が減少し、515 nm 付近のアクセプター蛍光が増大した¹³⁾ (図 6)。この結果は、重なり積分をスイッチとした検出原理が機能することを示している。エチレン鎖をリンカーにもつ化合物 2 では蛍光強度は弱く、この場合も色素会合を妨げるためにリジッドなリンカーが必要であった。

特筆すべき結果として、上記センサー分子 1 を用いて生物応用に成功し、細胞増殖時の PTP 活性の変化をはじめて可視化できたことがあげられる。通常の細胞では、細胞増殖時は細胞内の酸化ストレスが強くなり、PTP 活性は抑えられている。しかし、細胞が増殖し接触阻害を起こした場合は PTP 活性が高くなり、増殖阻害が起こることがはじめて明らかになった。この場合、レシオ測定によって細胞内に導入したセンサー分子の濃度差を補正できることが特に有効であった。

2. ま と め

本稿では、生物応用に成功したセンサー分子の開発過程について紹介した。ここで特に、センサー分子のターゲット選びが開発成功に最も重要であることを強調しておきたい。ターゲット選びには、どのようなセンサーを作製すれば、どの生物現象が明らかになるかという生物学上の疑問点が重要なのである。この対象設定によって、研究全体の方向性が決まる。そして、この生物学の問題点解決のための新しい分子デザインが生まれる。

文 献

- 1) R. Y. Tsien and A. T. Harootunian: "Practical design criteria for a dynamic ratio imaging-system," *Cell Calcium*, **11** (1990) 93-109.
- 2) S. R. Adams, A. T. Harootunian, Y. J. Buechler, S. S. Taylor and R. Y. Tsien: "Fluorescence ratio imaging of cyclic AMP in single cells," *Nature*, **349** (1991) 694-697.
- 3) M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward and D. C. Prasher: "Green fluorescent protein as a marker for gene-expression," *Science*, **263** (1994) 802-805.
- 4) A. Miyawaki, J. Llopis, R. Heim, J. M. McCaffery, J. A. Adams, M. Ikura and R. Y. Tsien: "Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin," *Nature*, **388** (1997) 882-887.
- 5) L. Stryer: "Fluorescence energy-transfer as a spectroscopic ruler," *Annu. Rev. Biochem.*, **47** (1978) 819-846.
- 6) J. R. Lakowicz: *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 1999) pp. 367-394.
- 7) S. Mizukami, K. Kikuchi, T. Higuchi, Y. Urano, T. Mashima, T. Tsuruo and T. Nagano: "Imaging of Caspase-3 activation in HeLa cells stimulated with etoposide using a novel fluorescent probe," *FEBS Lett.*, **453** (1999) 356-360.
- 8) B. Z. Packard, D. D. Toptygin, A. Komoriya and L. Brand: "Characterization of fluorescence quenching in bifluorophoric protease substrates," *Biophys. Chem.*, **67** (1997) 167-176.
- 9) K. Kikuchi, H. Takakusa and T. Nagano: "Recent

- advances in design of small molecule based FRET sensors for cell biology," *Trends Anal. Chem.*, **23** (2004) 407-415.
- 10) H. Takakusa, K. Kikuchi, Y. Urano, T. Higuchi and T. Nagano: "Intramolecular fluorescence resonance energy transfer system with coumarin donor included in beta-cyclodextrin," *Anal. Chem.*, **73** (2001) 939-942.
 - 11) Y. Kawanishi, K. Kikuchi, H. Takakusa, S. Mizukami, Y. Urano, T. Higuchi and T. Nagano: "Design and synthesis of intramolecular resonance energy transfer probes for use in ratiometric measurements in aqueous solution," *Angew. Chem. Int. Edit.*, **39** (2000) 3438-3440.
 - 12) H. Takakusa, K. Kikuchi, Y. Urano, S. Sakamoto, K. Yamaguchi and T. Nagano: "Design and synthesis of an enzyme-cleavable sensor molecule for phosphodiesterase activity based on fluorescence resonance energy transfer," *J. Am. Chem. Soc.*, **124** (2002) 1653-1657.
 - 13) H. Takakusa, K. Kikuchi, Y. Urano, H. Kojima and T. Nagano: "A novel design method of ratiometric fluorescent probes based on fluorescence resonance energy transfer switching by spectral overlap integral," *Chem. Eur. J.*, **9** (2003) 1479-1485.

(2004年10月29日受理)