

赤い蛍光で細胞内カルシウムイオン濃度の変動を画像化できる蛍光試薬

チームリーダー 花岡健二郎（東京大学大学院薬学系研究科・准教授）

Keyword

赤い蛍光、蛍光プローブ、ケイ素、カルシウム、バイオイメージング

タイプ 要素技術タイプ

開発課題名 次世代型蛍光プローブの創製を目指した新規蛍光団の開発

■参画機関：なし

■開発期間：平成23～26年度（予定）

課題概要

生命科学研究において、生体応用における多くの利点から緑色蛍光団である「フルオレセイン」は蛍光プローブや蛍光標識剤の基礎骨格として広く用いられ、古くから盛んに研究されてきた。本開発では、これまでのフルオレセインに関する全てのノウハウを適用可能であり、さらに100nmも長い吸収・蛍光波長を持つ新たな赤色蛍光団の開発を目指す。これによって、低い自家蛍光や高い組織透過性、マルチカラーイメージングへの応用など革新的な展開が可能となり、フルオレセインに取って代わる新たな蛍光団となることが期待される。

得られた開発成果の概要

■開発の背景／経緯

生命現象を理解するためには、生体内で起こるさまざまな現象をリアルタイムで高感度に観察することが重要である。蛍光イメージングはこのような観察を可能にする手法の一つで、蛍光試薬や蛍光タンパク質を用いて分子や細胞などを可視化する。さらに近年では、複数の分子や細胞を異なる色の蛍光試薬などで色分けすることで、それらの分布の違いや相互作用の有無などを直接観察する「マルチカラーイメージング」への要望が高まっている。

従来から広く用いられている代表的な蛍光試薬である「フルオレセイン」(図1左)は水溶性が高く、高い蛍光輝度を持ち、蛍光制御機構が確立されているなど優れた特徴がある。しかし、フルオレセインを含む緑色蛍光試薬は、他の緑色蛍光試薬や蛍光タンパク質と併用できない問題があった。近年、本開発チームはフルオレセインの酸素原子をケイ素原子に置換することで、フルオレセインの優れた特性を保持したまま、赤く光る蛍光色素「TokyoMagenta(TM)類」の開発に成功した(図1右)。TM類は水溶液中における吸収波長と蛍光波長がともに、フルオレセインと比較して90nmもの大きな長波長化を示すことから、フルオレセインに比べて組織透過性に優れている上に、光細胞毒性が小さいという利点がある。開発チームはTM類を用いて、細胞質に均一に分布し、細胞内部におけるカルシウム濃度変化を可視化できる赤色蛍光試薬『CaTM-2』の開発に成功した。

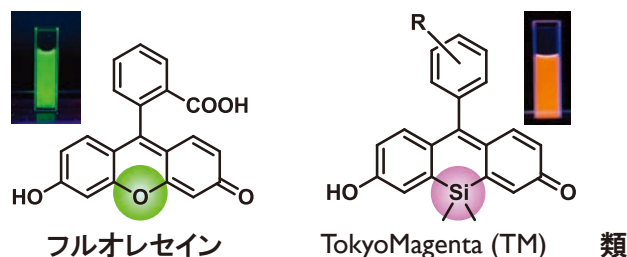


図1 フルオレセインとTokyoMagenta類
フルオレセインの緑色で示したO原子をSi原子(紫色で示した部分)に置換することで、赤色領域に吸収・蛍光波長(582nm/598nm)を持つTokyoMagenta(TM)類の開発に成功した。

■開発の成果

『CaTM-2』は、カルシウムイオンの濃度が高くなるにつれて強い蛍光を発することから、カルシウムイオンの濃度分布やその変化を可視化することができる。さらに、細胞膜を透過できるように改良した『CaTM-2 AM』の開発にも成功した(図2)。実際にCaTM-2 AMを用いて、生きた細胞がヒスタミン刺激を受けたときの細胞質内のカルシウムイオン濃度の変動を画像化することに成功した(図3a-d)。また、従来から使用されている赤く光るカルシウム蛍光試薬であるRhod-2はミトコンドリアに局在する性質があるため、細胞質におけるカルシウムイオン濃度変動の測定には適さないことが分かる(図3e-h)。『CaTM-2』および『CaTM-2 AM』はタカラバイオ株式会社より市販化された。

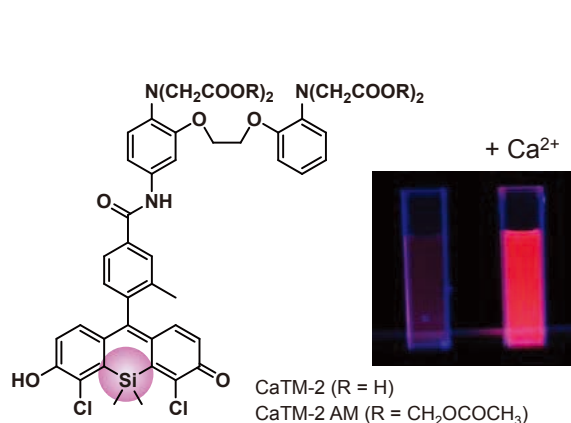


図2 開発した赤く光るカルシウム蛍光試薬

(左) 今回開発に成功した赤く光るカルシウム蛍光試薬『CaTM-2』および『CaTM-2 AM』。(右) カルシウム蛍光試薬を含んだ溶液中でのカルシウムイオンの濃度上昇に伴う蛍光上昇。カルシウムイオン濃度の上昇に伴い、蛍光試薬由来の609 nmの赤い蛍光の上昇が観察される。

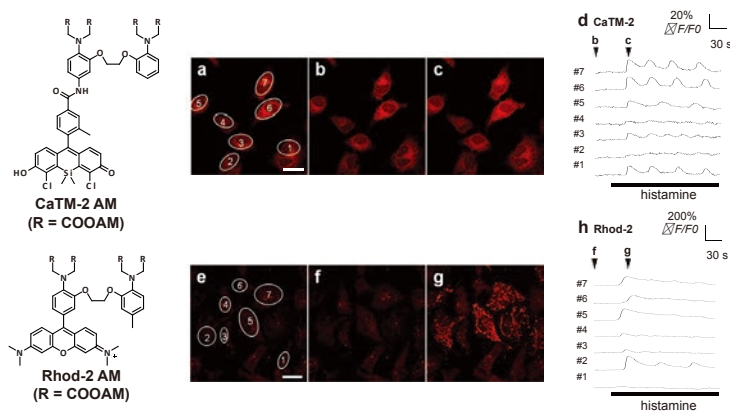


図3 ヒスタミン刺激による細胞内カルシウムイオン濃度変動の画像化

(a-d) CaTM-2 AMをHeLa細胞に導入し、ヒスタミン刺激を行った時の蛍光像(a-c)および、(a)内に1~7で示した各細胞における蛍光強度の時間変化(d)。CaTM-2が細胞質に分布し、カルシウムイオン濃度の変動をとらえていることが観察される。

(e-h) 既存の赤色蛍光試薬であるRhod-2 AMを用いて、(a-d)と同じ実験を行った時の画像。Rhod-2がミトコンドリアに局在する性質があるので、ミトコンドリアでのカルシウムイオン濃度の変動をとらえていることが観察される。

緑色蛍光試薬との併用で生命現象のマルチカラー観察を可能に

カルシウムイオンは多くの生命現象に関わっており、筋収縮や脳神経活動などに伴って濃度分布が変化する。そのため、生きた細胞内部のカルシウムイオン濃度について、その時間的変動や場所の情報を画像としてとらえることで、様々な生体活動の理解を深めることができる。今回、細胞質におけるカルシウム濃度変化を

可視化できる赤色蛍光試薬の開発に成功し、本研究分野がさらに進展することが期待される。また、TM類は、他の赤色蛍光プローブへの応用も可能であり、本開発の成果は、複数の生体分子を異なる色の蛍光色素で可視化して同時に画像化する『マルチカラーイメージング』を幅広い分野に応用できると期待される。

上記成果の科学技術的根拠

【特許出願】

1. 特願2013-042346、発明者：花岡健二郎、長野哲雄、平林和久、「蛍光プローブ」、出願人：国立大学法人東京大学
2. PCT/JP2013/053662、発明者：花岡健二郎、長野哲雄、平林和久、土岐裕子、「蛍光プローブ」、出願人：国立大学法人東京大学
3. PCT/JP2012/053853、発明者：花岡健二郎、長野哲雄、小出裕一郎、江川亮寛、「蛍光プローブ」、出願人：国立大学法人東京大学
4. PCT/JP2012/051122、発明者：花岡健二郎、長野哲雄、小出裕一郎、江川亮寛、平林和久、「蛍光プローブ」、出願人：国立大学法人東京大学

【発表論文等】

1. Takahiro Egawa, Kazuhisa Hirabayashi, Yuichiro Koide, Chiaki Kobayashi, Naoya Takahashi, Tomoko Mineno, Takuya Terai, Tasuku Ueno, Toru Komatsu, Yuji Ikegaya, Norio Matsuki, Tetsuo Nagano, Kenjiro Hanaoka, "Red Fluorescence Probe for Monitoring Dynamics of Cytoplasmic Calcium Ion", *Angew. Chem. Int. Ed.*, 52, 3874-3877 (2013).
2. Takahiro Egawa, Yuichiro Koide, Kenjiro Hanaoka, Toru Komatsu, Takuya Terai, Tetsuo Nagano, "Development of a Fluorescein Analogue, TokyoMagenta, as a Novel Scaffold for Fluorescence Probes in Red Region", *Chem. Commun.*, 47, 4162-4164 (2011).