

# レシオイメージングを可能とする FRET型蛍光プローブの開発

菊地 和也

現在はポストゲノム時代であるが、この時代の生物学研究の大きな目標として生体内に機能している分子の役割を機能しているその場で明らかにすることが挙げられる。光を用いて生体内に機能する分子を可視化することができれば、細胞をすりつぶした状態では得ることができない生きた状態における分子動態を明らかにできると考えられる。このため、化学情報を読み取り可能な光情報へと変換できるセンサー分子をデザイン・合成し生物応用に成功した。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ないで、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・合成し直接細胞に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。

## 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挙げられる。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等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<sup>1)</sup>。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ー分子が必要となる。このため、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初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<sup>2)</sup>。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<sup>3)</sup> が盛んになり、1997年にCa<sup>2+</sup>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<sup>4)</sup>、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) とも呼ばれ、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<sup>5)</sup>。

## 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。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Försterの関係式 (1) に従い移動速度定数 $k_T$ が成り立つ<sup>6)</sup>。

$$k_T = \{9000 (\ln 10) \kappa^2 J / 128 \pi^5 n^4 N_A r^6\} k_r \quad (1)$$

( $n$ 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 $k_T$ 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 ( $\kappa^2$ ,  $J$ ,  $r$ ) を変化させることで $k_T$ 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<sup>7)</sup>。

- 1)  $\kappa^2$ : 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 から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2/3に近似している. 現在までに,  $\kappa^2$ を変化させ得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 $k_T$ 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.  $k_T$ は $1/r^6$ に比例する. よって, 距離が大きくなると $k_T$ 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.

### 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Förster半径( $R_0$ )と呼ばれ, 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. 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時に活性化されるCaspase3活性を可視化しようと研究を開始した. 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<sup>7)</sup>. 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<sup>8)</sup>. しかし, 蛍光センサーとして細胞や生体組織で応用するためには, 水溶液中で機能しなければならない<sup>9)</sup>. このため, 水溶液中での色素会合を妨げることを狙って分子デザインを行った.

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. リンカーとしてはflexibleなエチレンとrigid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. エチレン鎖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<sup>10)</sup>. この理由は, シクロヘキサン構造はrigid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, control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. 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<sup>11)</sup>. 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.

### 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

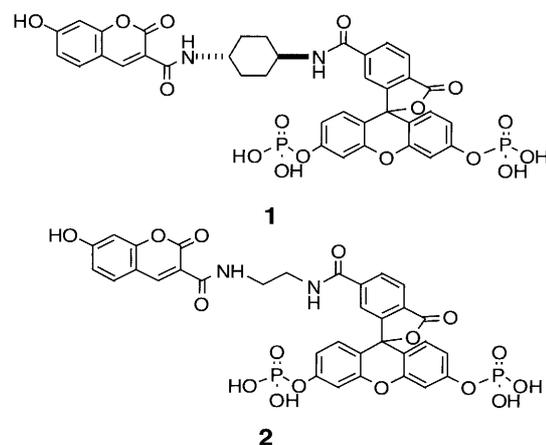


図1. 重なり積分変化型PTP蛍光センサー

## 特 集

をとり、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1)。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持つのにに対し、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元の状態に戻し、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。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1)。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<sup>12)</sup>(図2)。この結果

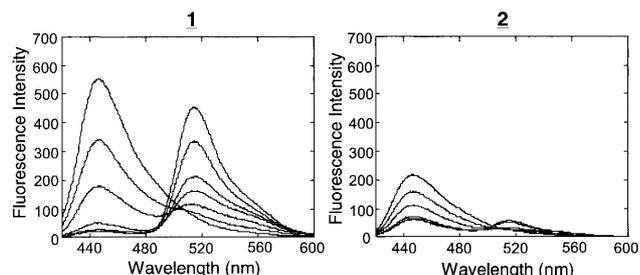


図2. PTP蛍光センサーの蛍光スペクトル変化

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持つ化合物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rigid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活性の変化を初めて可視化できたことが挙げられる。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初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。

生物応用の成功には、センサー分子のターゲット選びが重要である。つまり、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) Tsien, R. Y. and Harootunian, A. T.: *Cell Calcium*, **11**, 93 (1990).
- 2) Adams, S. R. *et al.*: *Nature*, **349**, 694 (1991).
- 3) Chalfie, M. *et al.*: *Science*, **263**, 802 (1994).
- 4) Miyawaki, A. *et al.*: *Nature*, **388**, 882 (1997).
- 5) Stryer, L.: *Annu. Rev. Biochem.*, **47**, 819 (1978).
- 6) Lakowicz, J. R.: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, p.367, Kluwer Academic, New York (1999).
- 7) Mizukami, S. *et al.*: *FEBS Lett.*, **453**, 356 (1999).
- 8) Packard, B. Z. *et al.*: *Biophys. Chem.*, **67**, 167 (1997).
- 9) Kikuchi, K. *et al.*: *Trends Anal. Chem.*, **23**, 407 (2004).
- 10) Kawanishi, Y. *et al.*: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **39**, 3438 (2000).
- 11) Takakusa, H. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 1653 (2002).
- 12) Takakusa, H. *et al.*: *Chem. Eur. J.*, **9**, 1479 (2003).