

細胞機能を覗く分子デザイン

菊地 和也

1 はじめに

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、生理的条件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可視化することができるセンサー分子をデザイン・合成し、生物応用を行った。この結果、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) を応用した細胞内酵素活性センサー分子について紹介する。

2 FRET 型蛍光センサー分子の開発

2.1 レシオ測定の重要性

蛍光センサー分子を用いて実際に生物応用を行う際には、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, 極性の変化等)、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。これら測定誤差を減ずる測定法として、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ー分子が必要となる。このレシオ測定用センサー分子の波長変化メカニズムは2通りに分類される。それらは

- 1) 測定対象分子によって、蛍光センサー自身の蛍光・励起波長が変化するもの^{2)~4)}
- 2) FRET の効率変化によって、蛍光・励起波長が変化するもの

である。1)には fura-2⁴⁾ や indo-1 等の Ca²⁺ センサー分子が含まれる。2)としては、1997年に GFP を用いた cameleon が報告され⁵⁾、これ以降、緑色蛍光タンパク質 (green fluorescence protein, GFP) による FRET センサーが多く報告され、DNA レベルでのセンサーデザインが可能となっている。この場合の利点は、遺伝子工学の手法を用いてセンサータンパク質発現が容易にできることである。これに対し、本研究では小分子センサーをデザイン・合成して生物応用を行っている。この場合の利点として、1) 分子デザインを自由に行うことができること、

- 2) 蛍光強度が強い分子を作製できること等が挙げられる。

2.2 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⁶⁾。

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

(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、以下の三つの因子 (κ^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。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。
- 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。
- 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。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デザインを行った例を紹介する。

2.3 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。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。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二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等の有機溶媒に溶かした場合は FRET が観測される⁸⁾。蛍光色素は一般に疎水的な構造を有しているた

め、水溶液中では無蛍光性の会合体を形成する。しかし、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。この結果を考察し、以降の研究では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。

次に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、flexibleなリンカーで繋ぐと、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(βCD)を加えたところ、アクセプター蛍光の上昇が観測された。さらに分子内にβCDを結合させた化合物を合成し、FRET由来の蛍光を確認した⁹⁾。この結果より、水中における会合を阻害することでFRETが起こることが示された。しかし、βCD等の大きい分子で修飾を行った場合、生物応用へは適さない。そこで、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(図1)。エチレン鎖二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二つ導入した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)¹⁰⁾。

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。さらに、酵素反応に最適なリンカーを選択し、フェニル基を二つリンカーとしたCPF4が最適であることが示され、酵素活性によって515nmのアクセプター蛍光が減少して450nm付近のドナー蛍光が増大した¹¹⁾。

2.4 重なり積分変化型 FRET センサー分子

次に、酵素との反応によって重なり積分が変化するセンサー

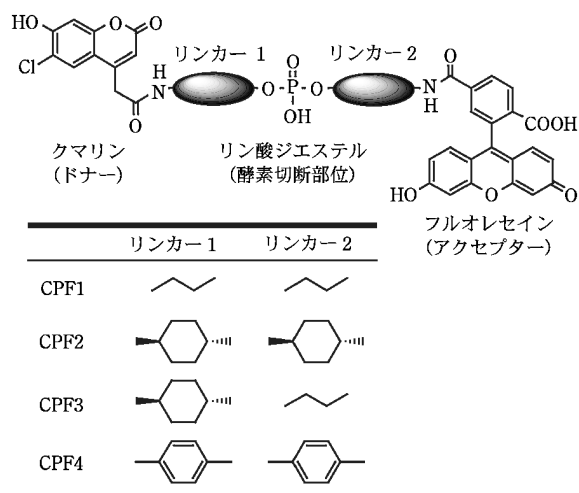


図1 CPF 類の構造式

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二つのコンホメーションをとり、異なる吸収スペクトルを示す。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3)。

キノイド型のフルオレセインは490nm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、キノイド型は重なり積分を持つのにに対し、ラクトン型では重なりは存在しない。従って、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。この原理を使って、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はチロシンの脱リン酸化を行う酵素であり、インスリンシグナル伝達、細胞の分化・成長等において重要な役割を果たしている。PTP蛍光センサー分子として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4)。

リンカーには、色素の会合で消光しないようにシクロヘキサン構造を用いた。水溶液中で化合物1をドナーの励起波長400nmで励起したところ、450nm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、450nm付近のドナー蛍光が減少し、515nm付近のアクセプター蛍光が増大した¹²⁾(図4)。重なり積分をスイッチとしたセンサー分子の設計方法は、フルオレセインに導入する置換基だけを変えることで、他の加水分解酵素にも応用できると考えられる。

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。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

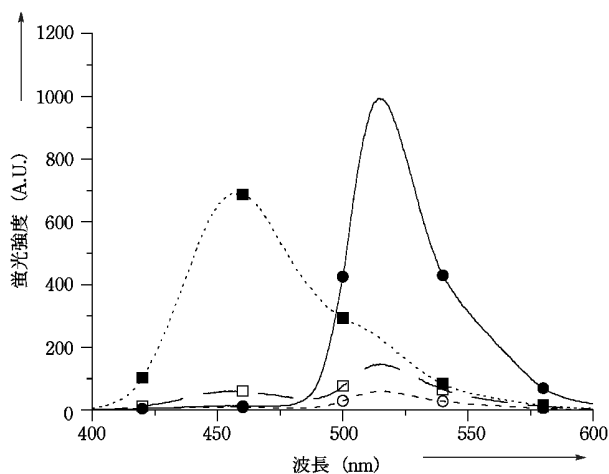
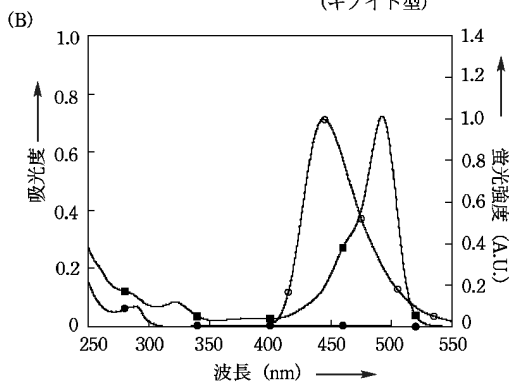
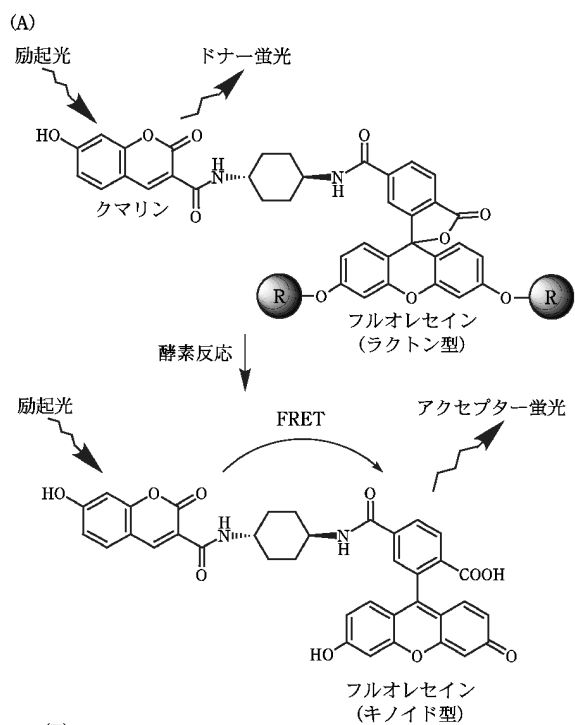


図2 CPF 類の水溶液の蛍光スペクトル



○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

(A)のRは酵素によって加水分解を受ける基質構造を表す。

図3 酵素反応によるラクトン型からキノイド型への変化(A)と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(B)

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。

3 おわりに

このほか、 Zn^{2+} センサー分子についても生物応用に成功し、新しい生物学知見が得られている¹³⁾¹⁴⁾。ここで特に、センサー分子のターゲット選別が開発成功に最も重要であることを強調しておきたい。ターゲット選別には、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である。

前述のとおり、現在ではポストゲノム時代の研究目標に生きた状態の作用解析が挙げられるようになってきている。この目的にセンサー分子のデザイン・合成はまさに合致している。この背景も追い風になっており、現在ではセンサー分子についての報文が多く見られるようになってきている。今後、さらに巧妙な分子デザインが登場し生物応用が進行することが大いに期待できる分野であると考えている。

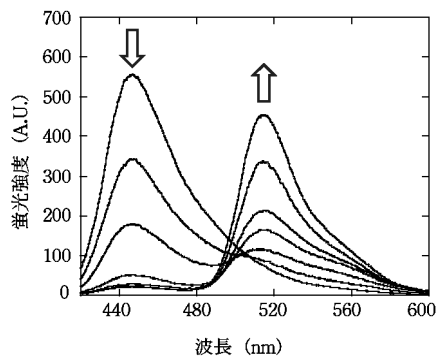
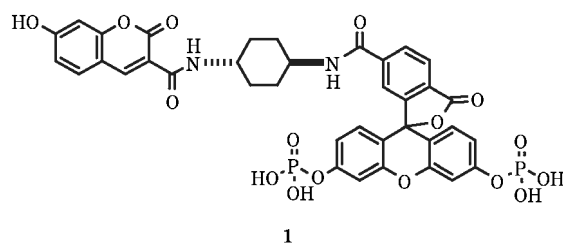


図4 PTP 蛍光センサー分子化合物1の構造式及び酵素反応によるスペクトル変化

文献

- 1) R. Y. Tsien, A. T. Harootunian : *Cell Calcium*, **11**, 93 (1990).
- 2) S. Mizukami, T. Nagano, Y. Urano, A. Odani, K. Kikuchi : *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 3920 (2002).
- 3) S. Maruyama, K. Kikuchi, T. Hirano, Y. Urano, T. Nagano : *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 10650 (2002).
- 4) G. Grynkiewicz, M. Poenie, R. Y. Tsien : *J. Biol. Chem.*, **260**, 3440 (1985).
- 5) A. Miyawaki, J. Llopis, R. Heim, J. M. McCaffery, J. A. Adams, M. Ikura, R. Y. Tsien : *Nature*, **388**, 882 (1997).
- 6) J. R. Lakowicz : "Principles of Fluorescence Spectroscopy", 367 (1999) (Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York).
- 7) K. Kikuchi, H. Takakusa, T. Nagano : *Trends Anal. Chem.*, **23**, 407 (2004).
- 8) S. Mizukami, K. Kikuchi, T. Higuchi, Y. Urano, T. Mashima, T. Tsuruo, T. Nagano : *FEBS Lett.*, **453**, 356 (1999).
- 9) H. Takakusa, K. Kikuchi, Y. Urano, T. Higuchi, T. Nagano : *Anal. Chem.*, **73**, 939 (2001).
- 10) Y. Kawanishi, K. Kikuchi, H. Takakusa, S. Mizukami, Y. Urano, T. Higuchi, T. Nagano : *Angew. Chem. Int. Ed.*, **39**, 3438 (2000).
- 11) H. Takakusa, K. Kikuchi, Y. Urano, S. Sakamoto, K. Yamaguchi, T. Nagano : *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 1653 (2002).
- 12) H. Takakusa, K. Kikuchi, Y. Urano, H. Kojima, T. Nagano : *Chem. Eur. J.*, **9**, 1479 (2003).
- 13) S. Ueno, M. Tsukamoto, T. Hirano, K. Kikuchi, M. K. Yamada, M. Nishiyama, T. Nagano, N. Matsuki, Y. Ikegaya : *J. Cell. Biol.*, **158**, 215 (2002).
- 14) K. Kikuchi, K. Komatsu, T. Nagano : *Curr. Opi. Chem. Biol.*, **8**, 182 (2004).



菊地和也 (Kazuya KIKUCHI)

東京大学大学院薬学系研究科, 科学技術振興機構・さきがけ (〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1)。東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了。博士(薬学)。<現在の研究テーマ>生体内機能分子を可視化しない不活化するセンサー分子の創製。<趣味>水泳, ワイン, 山歩き。
E-mail : kkikuchi@mol.f.u-tokyo.ac.jp