



研究室紹介

光でみる生体内分子動態

菊地 和也*

Visualization of Biological Compounds Using Fluorescent Sensor Molecules

Key Words : Fluorescence, FRET, Molecular Design, Imaging

はじめに

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。

FRET型蛍光センサー分子の開発

1. レシオ測定的重要性

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、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。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、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



*Kazuya KIKUCHI
1965年7月生
1994年東京大学大学院薬学研究科博士課程修了
現在、大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻、教授、博士(薬学)、
Chemical Biology
TEL 06-6879-7924
FAX 06-6879-7875
E-mail: kkikuchi@mls.eng.osaka-u.ac.jp

ド鎖に蛍光色素を2つ導入することで実証された。

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_T , k_f , k_{nr} とするとFRETのエネルギー移動の効率 E_T は(1)式に表される。

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

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Försterの関係式(2)に従い移動速度定数 k_T が成り立つ。

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

(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_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(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。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、 κ^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、 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。

3 重なり積分変化型FRETセンサー分子

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紹介する。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。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対し、ラクトン型ではスペクトルの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

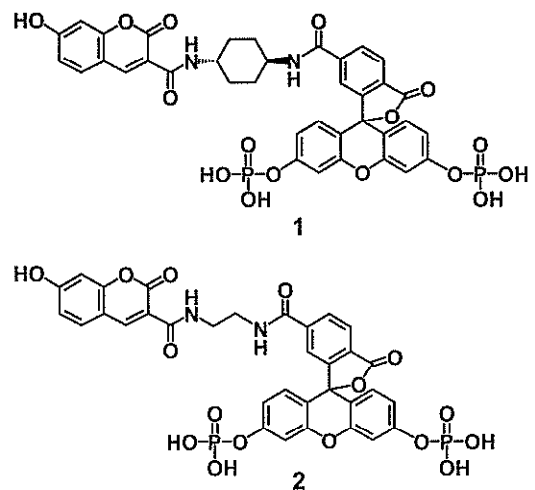


図1 PTP蛍光センサー分子1, 2の構造式

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、蛋白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(図2)。この結果は、重なり積分を

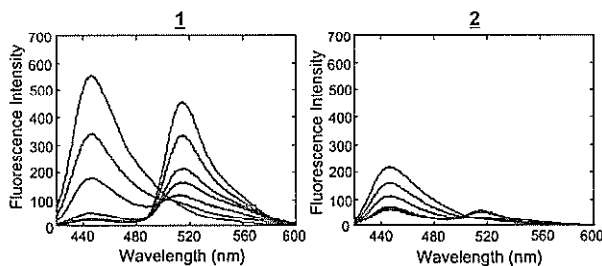


図2 PTPセンサー分子のPTP活性によるスペクトル変化

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。

おわりに

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。

この記事をお読みになり、著者の研究室の訪問見学をご希望の方は、当協会事務局へご連絡ください。

事務局で著者と日程を調整して、お知らせいたします。

申し込み期限：本誌発行から2ヵ月後の月末日

申し込み先：生産技術振興協会 tel 06-6944-0604 E-mail seisan@maple.ocn.ne.jp

必要事項：お名前、ご所属、希望日時(選択の幅をもたせてください)、複数人の場合はそれぞれのお名前、ご所属、代表者の連絡先

著者の都合でご希望に添えない場合もありますので、予めご了承ください。