

細胞内遊離銅イオンの比率測定型を可能にする 蛍光分子プローブの開発

Ratiometric Fluorescent Probe for Quantification of Labile Copper Ion in Living Cells

Huiying MU*

Disruption of copper ion homeostasis is known to cause a variety of diseases. Accurate measurement of copper ion concentrations using molecular probes provides valuable tools for the early diagnosis of such diseases and elucidating their progression mechanisms. To date, ratiometric molecular probes capable of detecting intracellular copper ion concentrations remain extremely limited. In this research, by utilizing a catalytic transformation reaction involving transition metal-mediated N–O bond cleavage of oxime esters, we developed a Cu-responsive ratiometric fluorescent probe A to detect copper ions in living cells.

1. 背景

体内に存在する銅は、酸化還元反応をはじめとするさまざまな生命活動において重要な役割を果たしている。一方で、銅イオン濃度のバランスが崩れると、種々の疾患を引き起こすことが知られている。例えば、銅イオンが過剰に蓄積すると、遺伝性疾患であるウィルソン病を発症し、重篤な肝障害へと進行する可能性がある。そのため、分子プローブを用いた銅イオン濃度の正確な測定および細胞レベルでの定量的マッピングは、これらの疾患の早期診断に寄与するだけでなく、分子レベルでの病因解明や進行機構の解析においても有用な手法となりうる。現在、生体内の銅イオン濃度を検出可能な比率測定型分子プローブは極めて限られている¹⁾。特に、Cu(I)に特異的に応答する有機反応も十分に確立されていない。

我々の研究室では、遷移金属イオンによるオキシムエステルのN–O結合開裂を経る触媒的変換反応を報告した²⁾(図1)。この反応が銅イオン選択的に、室温、水溶液中で、短時間内に高収率で進行することが明らかになった。この結果を基に、本研究では開発した触媒反応を生かして、銅イオン応答性比率測定型蛍光プローブの開発に着目する。設計した分子プローブは銅イオンに対して迅速かつ選択的に応答し、銅イオンの分布や濃度変化を生細胞レベルで精密に評価することができる。



図1 金属イオンによるオキシムエステルのN–O結合開裂反応。

2. 結果と考察

遷移金属である銅はオキシムエステルの開裂を触媒できることから、比率型蛍光プローブへの応用を検討した。銅イオン応答性オキシムエステル部位を含むリンカーでクマリンとローダミンを結合しており、銅イオン濃度の増大に伴いクマリンからローダミンへの分子内エネルギー移動効率が低下し、二つ異なる波長で蛍光強度が変化すると想定し、プローブAを合成した。

我々が開発してきたプローブAを用いて、吸収と蛍光スペクトルにより、銅イオンとの応答性の測定を行った。HEPES緩衝溶液 (pH 7.4, 0.1 M) 中でプローブAにCu(I)を30分間作用させ、作用前後の吸収および蛍光スペクトルを測定した(図2a)。銅イオンを作用させる前後において、吸収スペクトルには大きな変化が見られなかった。これは、銅イオンによるオキシムエステル部位の切断の有無にかかわらず、溶液中にはローダミン骨格とクマリン骨格が存在することを示している。一方、蛍光スペクトルでは、銅イオンを作用させた後クマリンに由来する蛍光(497 nm)が大幅に増加し、ローダミンに由来する蛍光(583 nm)が減少した。このことは、銅イオンの作用により、オキシムエステル部位が切断され、プローブAのクマリンからローダミンへのエネルギー移動が起こらなくなり、蛍光比率(F_{497}/F_{583})が変化すると結論付けられる。さらに、銅イオンとの反応性を時間経過とともに追跡したところ、15 min後の蛍光強度比率は約15倍になった(図2b)。また、様々な生物学的に重要な金属イオンとの反応性を調査したところ、プローブAは

優れた選択性を示し、他の金属イオンが共存しても銅イオンと良い反応性を持つことがわかった (図2c). また、肺がん細胞を用いて生細胞環境におけるプローブAと銅イオンの反応性を評価した. 過剰量の銅イオンの存在下で, green channelのクマリンに由来する蛍光シグナルが増強し, red channelのローダミンに由来する蛍光シグナルが弱くなった. 蛍光比率 ($F_{\text{green}}/F_{\text{red}}$) が速やかに増加した. このことから, プローブAは生体環境においても銅イオンにตอบสนองし, オキシムエステル結合の開裂により分子内エネルギー移動効率が低下することを確認した.

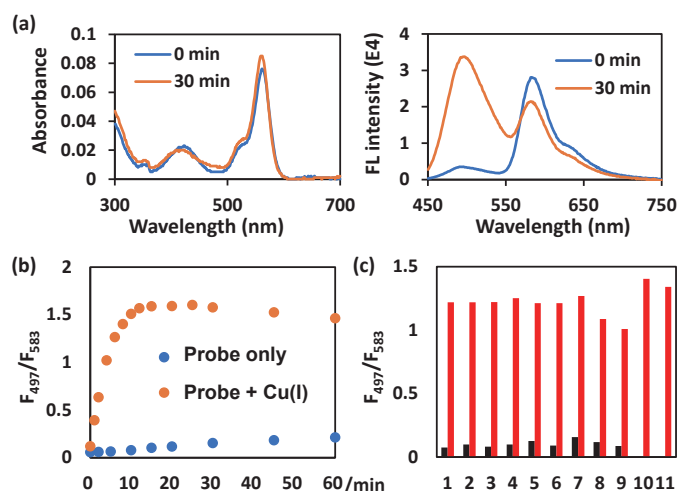


図2 (a) Cu(I)にตอบสนองしたプローブAの吸収(左)および蛍光(右)スペクトルの経時変化. (b) Cu(I)の添加の有無におけるプローブAの蛍光強度比 (F_{497}/F_{583}) の経時変化. (c) 各種生体関連金属イオンに対するプローブAの蛍光強度比 (F_{497}/F_{583}) の変化. 競合金属イオンを添加後, Cu(I)を処理した場合(赤色バー)および未処理の場合(黒色バー)を示す. 1. Na^+ ; 2. K^+ ; 3. Mg^{2+} ; 4. Ca^{2+} ; 5. Zn^{2+} ; 6. Co^{2+} ; 7. Ni^{2+} ; 8. Fe^{2+} ; 9. Fe^{3+} ; 10. Cu^+ ; 11. Cu^{2+} .

3. 今後の展望

本研究により, プローブAは緩衝溶液中および生細胞環境において銅イオンと選択的かつ迅速に反応し, 比率型蛍光変化することを明らかにした. 今後は, 銅イオンに対する親和性をさらに向上させるため, 適切なりガンドユニットの導入や分子構造の精密設計を行い, 競合分子存在下でも安定して機能するプローブの開発を目指す. また, 細胞内局在制御や応答速度の最適化を進めることで, より広範な生体内銅イオン動態解析への応用が期待される.

4. 謝辞

本研究は, 公益財団法人豊田理化学研究所の豊田理研スカラー助成のご支援によって行われました. 関係各位に心より深く感謝いたします. また, 異分野若手交流会において多くの研究者の皆様と交流する貴重な機会をいただき, 今後の研究の発展につながる有意義な時間となりました. このような交流の場をご提供いただきましたことにも, 心より御礼申し上げます. この場をお借りして, 改めて厚く御礼申し上げます.

REFERENCES

- 1) A. T. Pezaki, C. D. Matier, X. G. Gu, E. Kummelstedt, S. E. Bond, L. Torrente, K. L. Jordan-Sciutto, G. M. DeNicola, T. A. Su, D. C. Brady and C. J. Chang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **119** (2022) e2202736119.
- 2) T. Shimbayashi, D. Nakamoto, K. Okamoto and K. Ohe, *Org. Lett.*, **20** (2018) 3044.