

名古屋工業大学大学院 工学研究科

物質工学専攻

博士論文

細胞核と細胞膜インナーリーフレットを標的とした
局在性分子ツールの開発と応用

Development and application of new synthetic molecular tools that
target the nucleus and the inner plasma membrane in living cells

平成29年度

中村 彰伸

目次

第一章 序論

1.1 ミトコンドリア局在性化合物	… 1
1.2 本論文の構成	… 4
1.3 参考文献	… 5

第二章 Hoechst 連結法による核局在性蛍光プローブの開発

2.1 序	… 6
2.1.1 核局在性蛍光プローブ開発の現状	… 7
2.1.2 タンパク質タグを用いた小分子蛍光プローブの核局在化戦略	… 10
2.2 核局在性小分子蛍光プローブの合理的設計法の確立の意義	… 12
2.3 基本戦略：Hoechst 連結による小分子蛍光分子プローブの核局在化	… 12
2.3.1 分子設計戦略	… 12
2.4 結果	… 14
2.4.1 Hoechst 連結 fluorescein の設計と特性評価	… 14
2.4.2 Hoechst 連結法の汎用性の評価	… 23
2.4.3 Hoechst 連結蛍光プローブの細胞毒性の評価	… 30
2.5 考察	… 31
2.5.1 Hoechst 連結蛍光プローブと DNA の親和性について	… 31
2.5.2 Hoechst 連結法と pyrrole-imidazole polyamide 連結法の比較	… 31
2.6 結論	… 33
2.7 実験方法	… 34
2.7.1 化合物合成に使用した試薬、測定装置	… 34
2.7.2 hoeBoc (化合物 4)の合成	… 35
2.7.3 Hoechst 連結蛍光プローブの合成	… 37
2.7.4 コントロール実験用化合物の合成	… 41
2.7.5 Hoechst 連結蛍光プローブの光化学特性の評価 (<i>in vitro</i>)	… 42
2.7.6 細胞実験	… 42
2.8 参考文献	… 44

第三章 Hoechst 連結 fluorescein を用いた核内選択的 pH 測定技術の開発

3.1 序	… 45
3.1.1 hoeFL を用いた核内選択的 pH 選択的センシングの基本戦略	… 45
3.2 結果	… 46
3.2.1 hoeFL の DNA 結合能の pH 依存性の評価	… 46
3.2.2 hoeFL-DNA 複合体の pH 応答能の評価と励起波長の検討 (<i>in vitro</i>)	… 47
3.2.3 hoeFL _{DNA} の pH 応答メカニズム	… 48
3.2.4 細胞実験	… 52
3.5 結論	… 54
3.6 実験方法	… 55
3.7 参考文献	… 56

第四章 細胞内膜を標的とした自己局在性小分子リガンドの開発と細胞内シグナル独立制御技術の開発

4.1.序	… 57
4.1.1 タンパク質の細胞内膜局在化に基づく細胞内シグナルの活性制御機構	… 58
4.2 目的	… 59
4.3 結果	… 60
4.3.1 iPM 局在性リガンドの開発とタンパク質の局在移行制御に基づく細胞内シグナルの制御	…61
4.3.2 SNAP タグラベル化システムを用いたタンパク質局在移行誘導システムの開発	… 62
4.3.3 mgeBCP を用いた SNAP タグの局在移行メカニズム	… 73
4.3.4 SNAP タグの iPM 選択的局在移行誘導	… 74
4.3.5 mgeBCP を用いた K6-SNAP の iPM 局在化におけるパルミトイル化の必要性の評価	… 78
4.3.6 リジン付加による eDHFR の iPM 選択的局在移行誘導	… 81
4.3.7 SNAP システムと eDHFR システムの局在移行誘導速度の解析	… 84
4.3.8 SNAP システムの iPM 局在化の持続時間	… 86
4.3.9 タンパク質の iPM 局在移行誘導に基づくシグナル伝達経路の人工活性化	… 87
4.3.10 SNAP システムと eDHFR システムの併用による 2 種類のシグナル伝達経路の独立制御	… 92
4.4 結論	… 101
4.5 実験方法	… 102
4.5.1 化合物合成に使用した試薬、測定装置	… 102
4.5.2 TMP-COOH の合成	… 102
4.5.3 mgeTMP の合成	… 105
4.5.4 プラスミド作製	… 107
4.5.5 細胞培養条件	… 115

4.5.6	恒常発現細胞の樹立	… 115
4.5.7	Western blot による SNAP タグと局在性 BCP リガンドの結合評価	… 117
4.5.8	共焦点レーザー顕微鏡観察時の細胞播種条件	… 118
4.5.9	eDHFR-GFP、K6-eDHFR-GFP、K6sp-eDHFR-GFP の局在移行誘導	… 118
4.5.10	局在性 BCP リガンド（化合物 6 , 7 , mgcBCP (8) , 9 ）を用いた SNAP-GFP の局在移行誘導	… 118
4.5.11	局在性 BCP リガンド（化合物 6 ）とゴルジ体マーカーの共染色	… 119
4.5.12	mgcBCP , mgcAc , mBCP , mgaBCP , mgsBCP を用いた SNAP-GFP、K6-SNAP-GFP の局在移行誘導	… 119
4.5.13	free-BCP 添加による SNAP-GFP、K6-SNAP-GFP の局在移行阻害	… 119
4.5.14	2-BP 処理時の SNAP-GFP、K6-SNAP-GFP の局在移行誘導	… 119
4.5.15	K6-SNAP-GFP の iPM 局在化の持続時間評価	… 120
4.5.16	K6-SNAP-RasGEF の iPM 局在移行誘導に伴う Ras/ERK 経路の人工活性化	… 120
4.5.17	K6sp-eDHFR-iSH の iPM 局在移行誘導に伴う PI3K/Akt 経路の人工活性化	… 120
4.5.18	K6-SNAP-GFP と K6sp-eDHFR-GFP の iPM 局在移行の独立制御	… 120
4.5.19	Ras/ERK 経路と PI3K/Akt 経路の独立活性化制御	… 121
4.5.20	Ras/ERK 経路活性化に伴う Akt の活性解析	… 121
4.5.21	PI3K/Akt 経路活性化に伴う ERK の活性解析	… 122
4.6	参考文献	… 123
第五章 結言		… 125
謝辞		… 127

第一章 序論

細胞は、生命の最小単位であり、ヒト細胞で直径~20 μm 、体積は~10 pL である。この小さな空間の中で 25,000 種類以上のタンパク質が関連する化学反応系（シグナル伝達）によりネットワークを構成し、細胞機能の恒常的に維持している^[1-1]。このわずかな空間で、細胞はどのようにして複雑な反応系を構築し、細胞機能を制御しているのだろうか。その答えの一つが、細胞内に存在するオルガネラに代表される細胞内区画領域であると考えられる。細胞は、区画領域ごとに配置する（局在化させる）タンパク質の種類や量を適切に調節することで、区画領域での反応を適切に制御している^{[1-2][1-3]}。それにより、さまざまな反応・分子プロセスを領域特異的に進行させることで複雑な分子プロセス・細胞機能を緻密に制御している^[1-1]。一方で、細胞内で進行するあらゆる化学反応を、有機化学的に合成した小分子蛍光プローブ・合成小分子リガンドを用いて自在に可視化・制御することは、細胞機能の制御機構を分子レベルで理解・制御するための強力なアプローチとなる。現在、ケミカルバイオロジーの分野において、多様なリガンド化合物や小分子蛍光プローブの開発が進められている。しかし、既存のリガンド化合物や蛍光プローブの多くは細胞全体を拡散する（拡散させて使用する）ようにデザインされている^[1-4]。一方で、もしリガンド化合物や蛍光プローブを細胞内のさまざまなオルガネラや区画領域に局在化させることができれば、細胞内区画領域で特異的に進行する分子プロセスや環境変化の選択的な可視化・センシング・制御が可能になり、細胞機能に対するより正確な解析・理解が可能になるものと期待できる^[1-5]。

1.1 ミトコンドリア局在性化合物

ミトコンドリアは、酸化的リン酸化による ATP 合成や活性酸素種（ROS）生産に関与し、細胞のエネルギー生産の場として重要な役割を担っている。ミトコンドリアは、酸化的リン酸化に由来するプロトンポンプの作用により、ミトコンドリアの膜電位は負であることが知られている^[1-7]。この特性から、ミトコンドリアマトリックス（ミトコンドリアの内側）は、脂溶性でかつカチオン性の（triphosponium cation, cationic peptide といった）小分子化合物を選択的に取り込む性質を示す（図 1）。この特性から triphosphonium cation は、さまざまな小分子化合物に対してミトコンドリア局在性を付与するタグとして広く用いられており、ミトコンドリア選択的な小分子蛍光プローブの局在化や薬剤をミトコンドリアに局在化させるための汎用的なアプローチとして認識されている^[1-6]。

Kelly らは、DNA と結合しクロスリンクを形成することで抗腫瘍活性を示す cisplatin アナログをリガンド化合物として選択し、D-arginine と L-cyclohexylalanine を連結することで開発したミトコンドリア局在性ペプチドに連結することで、ミトコンドリア局在性 cisplatin (mtPt) の開発に成功している。ただの cis-platin は核内の DNA に主に作用するが、mtPt はミトコンドリア局在化によって、ミトコンドリア DNA への選択的結合を達成している^[1-8a, b]。さらに、Kelly らは、ジヒドロ葉酸還元酵素（チミジン、プリン、アミノ酸合成合成に関与）のリガンド化合物で

ある methotrexate (Mtx) にミトコンドリア局在性ペプチドを連結した mt-Mtx を開発している^[1-8c]。Mtx は細菌の DHFR とヒト細胞の DHFR の両方に結合する。しかし、ヒト細胞において DHFR は細胞質に分布するタンパク質である。したがって、mt-Mtx は細菌に対して増殖阻害を示す一方で、ヒト細胞ではミトコンドリア局在化により薬効を抑えることが可能となる。

これらのアプローチは、細胞内の局所へ小分子リガンド化合物を局在化させるアプローチが、小分子リガンド化合物に新たな作用機序を合理的に付与することができることを示す重要な知見であると考えられる。

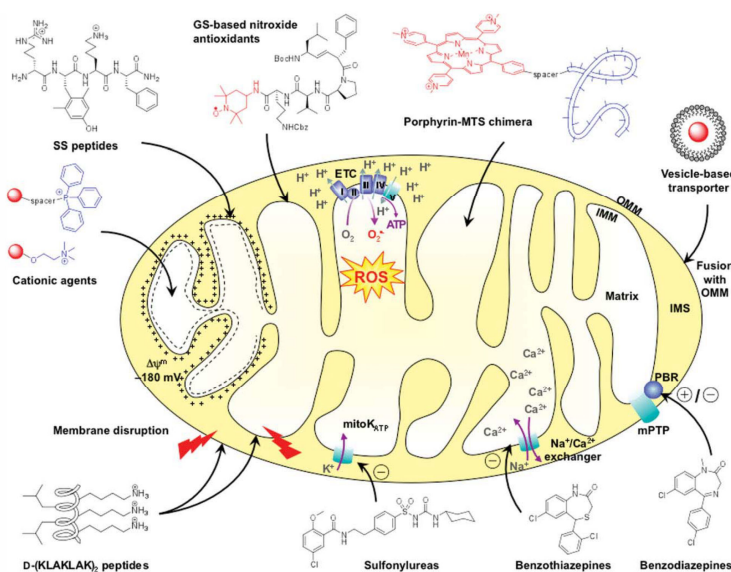
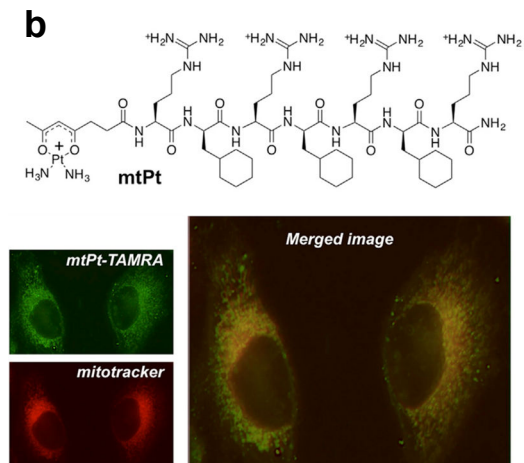
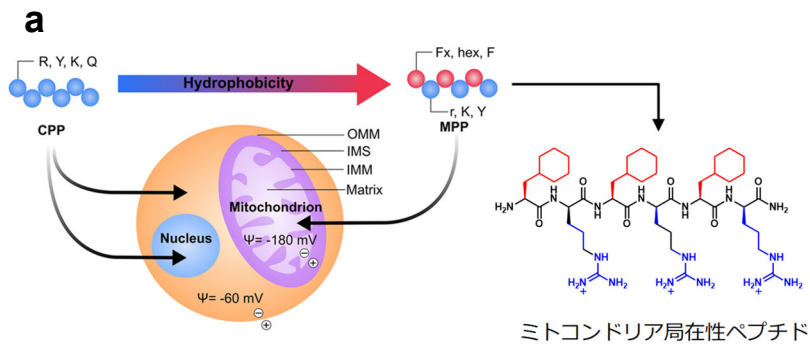


図 1 主要なミトコンドリア局在性小分子化合物^[1-6b]



ミトコンドリア局在性ペプチドを用いることで cisplatin を
ミトコンドリアDNA選択的に作用させることが可能

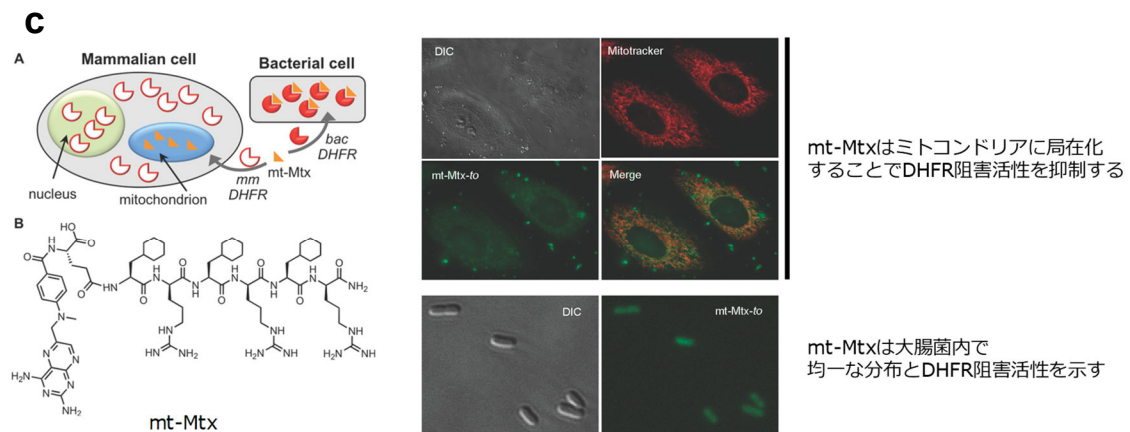


図 2 Kelly らが開発したミトコンドリア DNA 結合化合物; (a) ミトコンドリア局在性ペプチド,
(b) ミトコンドリア DNA に選択的に結合する cisplatin アナログ, (c) 大腸菌の DHFR 活性を阻
害し、ヒト細胞の DHFR 活性を阻害活性を抑制したミトコンドリア局在性 Mtx

1.2 本論文の構成

小分子蛍光プローブや小分子リガンドの細胞内局所への集積により拡散型では困難なオルガネラ内分子の選択的な可視化・制御が可能となる。「小分子化合物単独で」細胞内の特定領域を狙うための分子設計戦略は、細胞膜表層やミトコンドリアマトリックスといった一部の領域を除き、未だ発展途上の段階にあり極めて限定的なものである。任意の小分子化合物をさまざまなオルガネラに局在化させるための分子設計基盤を確立することは、生体関連化学やケミカルバイオロジー分野の極めて重要な課題の一つであると考えられる。

本研究では、化合物の局在化のための戦略が確立されていない細胞内区画領域に選択的に小分子蛍光プローブや小分子リガンド化合物を局在化させるための汎用的分子設計基盤を確立し、それらを用いたオルガネラ選択的な可視化・センシング・制御技術の開発を目指す。

第二章では、生命の設計図である DNA を収納する細胞核内へ選択的に小分子蛍光プローブを局在化させるための分子設計戦略の確立を目指した。DNA 結合化合物である Hoechst を既存のさまざまな拡散型蛍光色素に連結することで Hoechst 連結蛍光プローブを開発した。Hoechst 連結蛍光プローブは、化合物単独で生細胞の核内へ選択的に局在化することを示し、Hoechst 連結法が核局在性蛍光プローブを開発するための汎用的な分子設計戦略となることを実証した。また、Hoechst 連結蛍光プローブは、さまざまな細胞株や非固定組織において明確な核局在化を示し、核蛍光染色剤として広く利用できることが明らかとなった。

第三章では、第二章の Hoechst 連結法により開発した核局在性 fluorescein を構成する Hoechst と fluorescein が pH 応答性の蛍光プローブであることに着目し、両蛍光プローブの pH 依存的な蛍光強度比変化による核内選択的 pH 測定技術の開発を行った。本技術により得られた核内 pH は、過去の文献値と一致した。本成果は、生細胞の核内 pH を領域特異的に可視化するための基盤技術となり、核内 pH の制御機構を調べるための解析ツールとしての応用が期待できる。

第四章では、細胞内膜 (iPM) に局在化する小分子リガンド化合物 (iPM 局在性リガンド) の分子設計基盤の確立を目指した。iPM 局在性リガンドは、iPM 局在性の小分子化合物とリガンド化合物を連結することで開発した。この iPM 局在性リガンドは、それ自身が iPM へ局在化するだけでなく細胞質中のタンパク質を iPM へ局在化させ、そこにアンカリングできることを実証した。本技術を用いることで、タンパク質の細胞質から iPM への局在移行を起点に活性化するシグナル伝達経路を iPM 局在性リガンドの添加によりコンディショナルに活性化することに成功した。さらに、上記の iPM 局在性リガンドに対して直交性を有する第 2 の iPM 局在性リガンドを開発することに成功した。これら 2 種類の iPM 局在性リガンドを併用することで、単一細胞で 2 種類のタンパク質の細胞膜内膜局在化を独立に制御し、さらに 2 種類のシグナル伝達経路を任意のタイミングで独立に活性化可能な細胞内シグナルの人工制御システムの開発に成功した。

第五章では、本論文の成果を総括した。

1.3 参考文献

- [1-1] 江口至洋, “細胞のシステム生物学”, 共立出版, 初版 (2008)
- [1-2] (a) Fagerberg L. *et al.*, *J. Proteome Res.* **10**, 3766 (2011), (b) Duarte N.C. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 1777 (2007)
- [1-3] (a) Alberts B. *et al.*, *Molecular Biology of The Cell*, 5th ed., Garland Science, New York, 2008, (b) Kholodenko B.N. *et al.*, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 414 (2010)
- [1-4] Johnson I. and Spence M.T.Z., *The Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, 11th edn, ch. 8.1 and 12.5 (2010)
- [1-5] (a) Luliia L.X. *et al.*, *Nat. Chem. Biol.* **11**, 917 (2015), (b) Xu W. *et al.*, *Angew. Chem.* **55**, 13658 (2016), (c) Zhu H. *et al.*, *Acc. Chem. Res.* **49**, 2115 (2016)
- [1-6] (a) Weissig V. *et al.*, *Mitochondrion* **3**, 229 (2004), (b) Frantz M.-C. and Wipf P., *Environ. Mol. Mutagen.* **51**, 462 (2010), (c) Kaufmann A.M. and Krise J.P., *J. Pharm. Sci.* **96**, 729 (2007)
- [1-7] (a) Murphy M.P., *Biochim. Biophys. Acta* **977**, 123 (1989), (b) Kadenbach B., *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **1604**, 77 (2003)
- [1-8] (a) Horton K.L. *et al.*, *Chem. Biol.* **15**, 375 (2008), (b) Wisnovsky S.P. *et al.*, *Chem. Biol.* **20**, 1323 (2013), (c) Pereira M.P. and Kelly O.S., *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 3260 (2011)

第二章 Hoechst 連結法による核局在性蛍光プローブの開発

2.1 序

細胞核は細胞の設計図である遺伝子を収納している細胞内でもっとも重要なオルガネラの一つである。細胞生物学分野の研究において、この核の形態や核内の分子プロセスをリアルタイムに可視化するためのイメージング技術は、生命の恒常性維持のメカニズム解明に欠かすことのできない技術である。近年の顕微鏡観察技術の発展に伴い、単一細胞の複数の分子プロセスを同時に可視化するマルチカラーイメージングの需要が高まってきている。核局在性小分子蛍光プローブも例外ではなく、さまざまな波長で励起・検出できる蛍光プローブの開発が進められている^[2-1]。しかし、生細胞の核の標識・可視化には未だに紫外光励起／青色蛍光の Hoechst や DAPI が使用されている（図 1）^{[2-2][2-3]}。紫外光励起は DNA 損傷や自家蛍光の原因となるため、より長波長帯で励起し観察できる核局在性蛍光プローブが細胞や組織の観察に適しているはずである。次項より、核局在性蛍光プローブの例を示し、上記の背景を整理する。

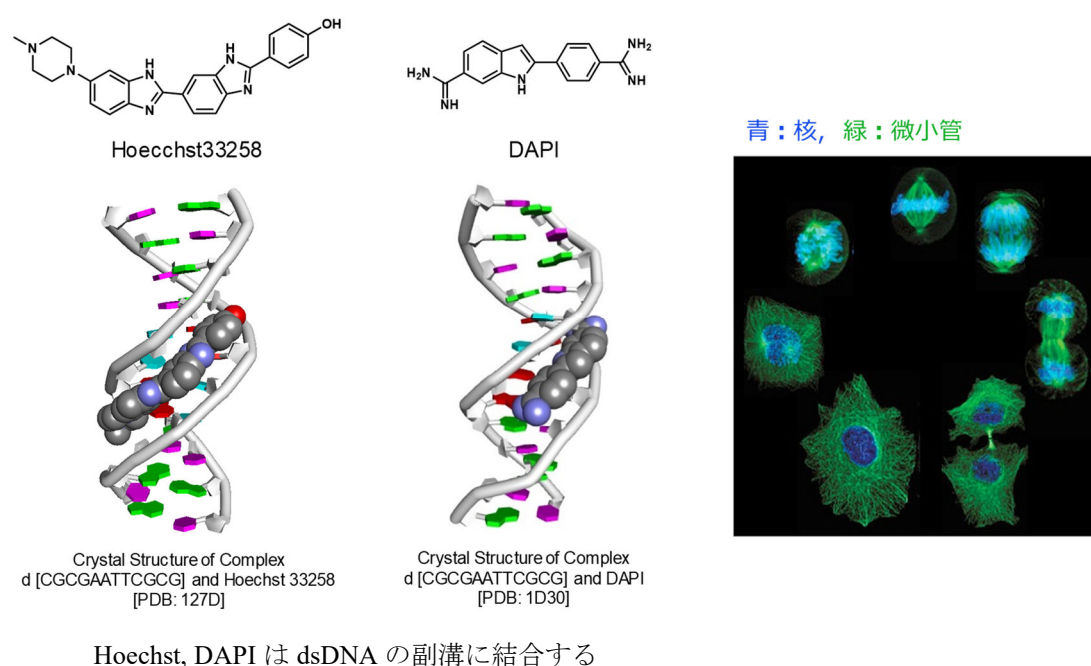


図 1 核局在性蛍光染色剤 Hoechst / DAPI の構造と Hoechst を用いた核染色の例

2.1.1 核局在性蛍光プローブ開発の現状

現行技術では、核局在性蛍光プローブの取得は、誘導体探索やライブラリースクリーニングから得られる場合が殆どである。誘導体探索は、既存の蛍光色素にさまざまな官能基を導入することで核局在性を付与する方法である。例えば、メチルピリジンやジメトキシアミンを蛍光色素に導入することで核局在性蛍光プローブを開発できることが報告されている(図 2)^[2-4]。しかし、誘導化により蛍光色素に核局在性を付与するためには、化合物を一つずつ合成し、核局在性の有無を評価しなければならない。また、誘導化法により多様な分子構造を実現することは一般的に困難である。

上記の問題の解決策として、ライブラリースクリーニングによる核局在性蛍光プローブの開発法が報告されている。Young らは、アルデヒド基を持つ化合物とヨードピリニジウム骨格を持つ化合物を組合せることで、styryl 骨格をベースとした蛍光プローブライブラリーを構築し、さまざまな波長・細胞内局在を示す蛍光プローブが取得できることを実証している(図 3)^[2-5]。同様に、Young らは、細胞膜透過性に優れる xanthone 骨格(AX)をベースとしたライブラリースクリーニングにより核局在性蛍光プローブの取得が可能であることを実証している(図 4)^[2-5d]。これらの報告は、化合物のライブラリースクリーニングが、核局在性蛍光プローブを取得するためのアプローチとしての有用性を示していると考えられる。

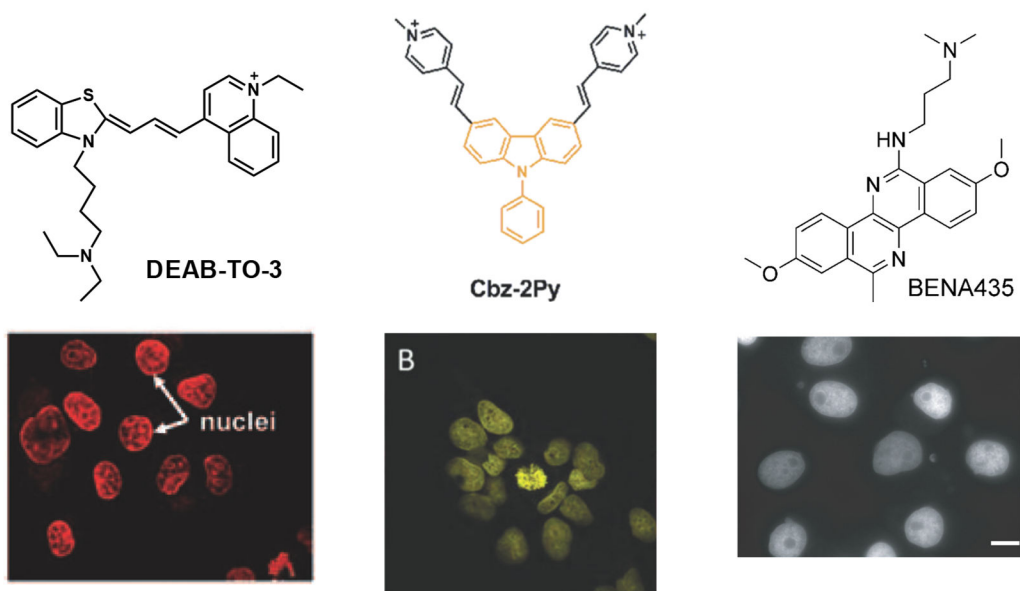


図 2 蛍光色素の誘導化法によって開発された核局在性蛍光プローブ^[2-4]

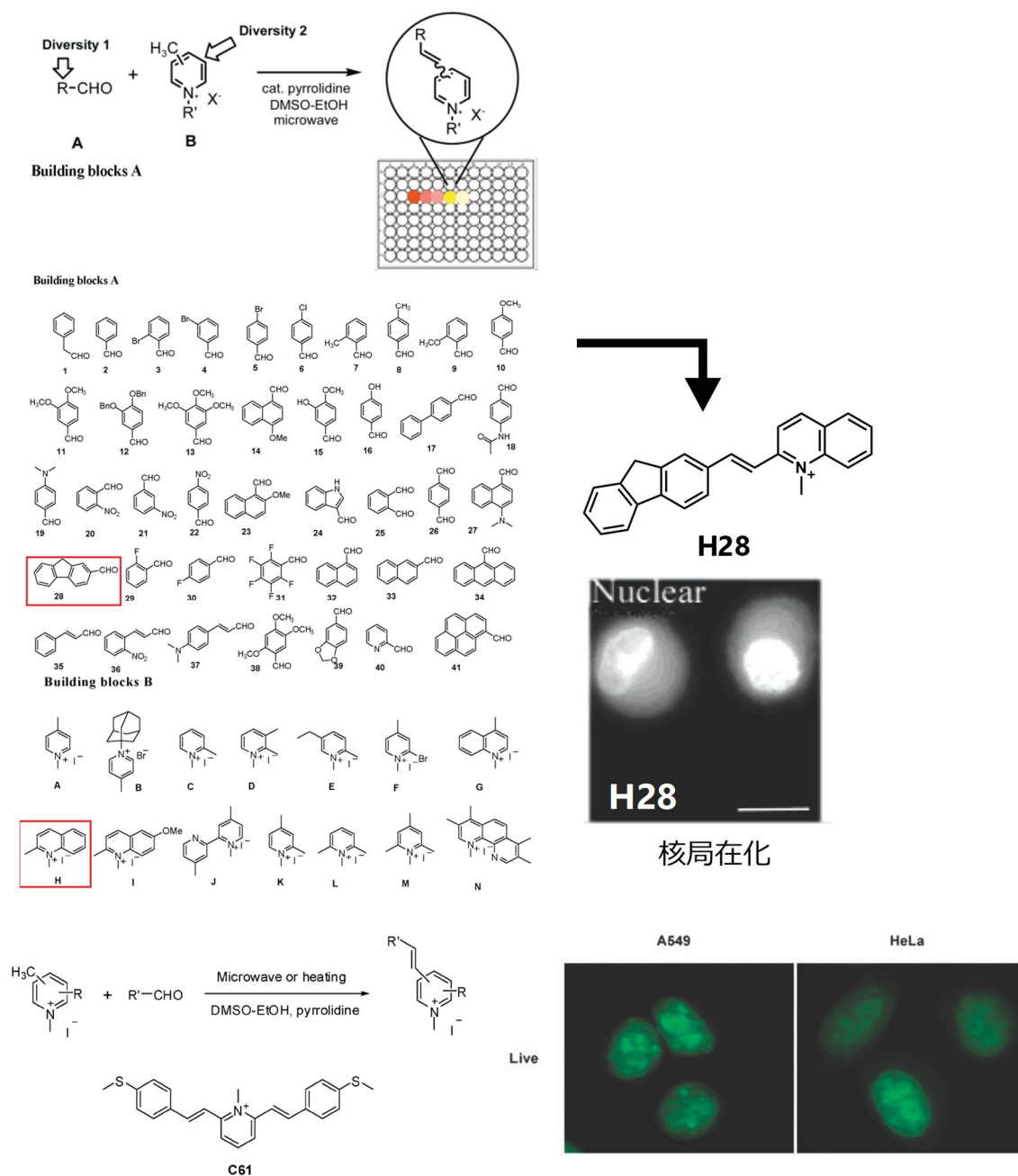


図 3 styryl 骨格ライブラリーを用いたスクリーニングによる核局在性化合物の取得^[2-5a, b]

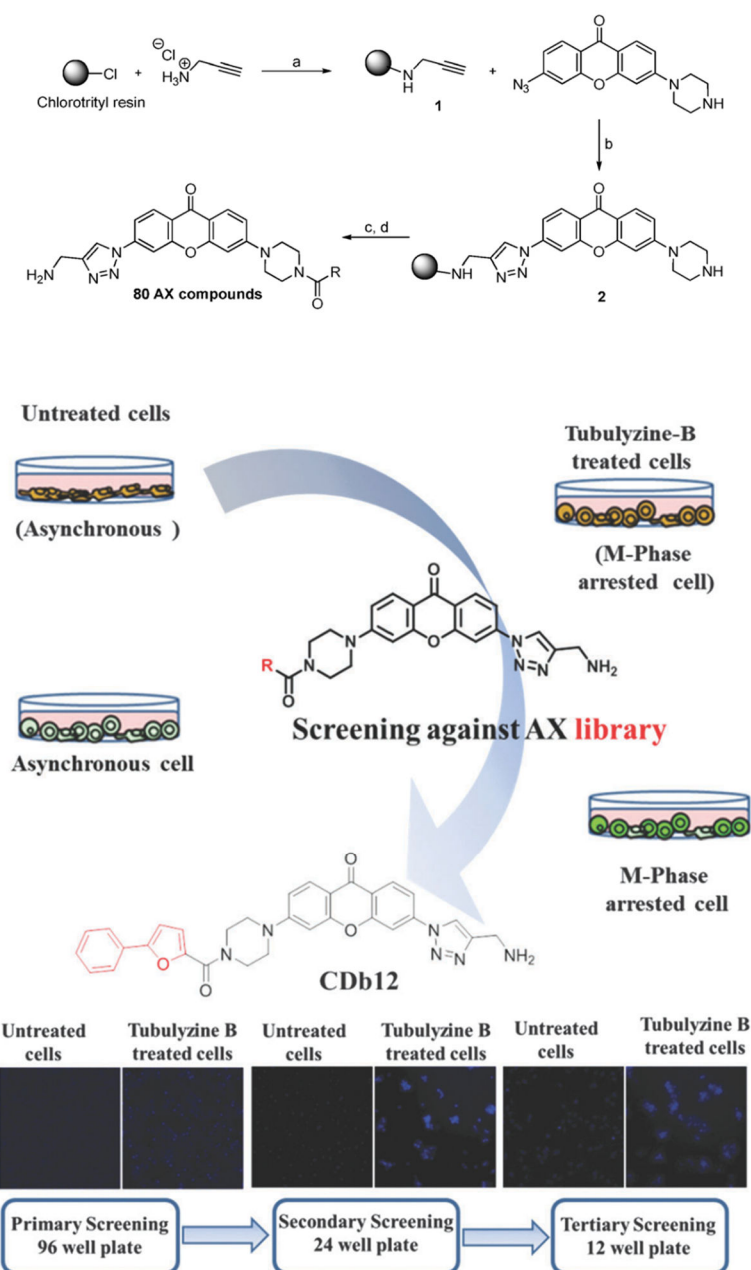


図 4 xanthone 骨格ライブラリーを用いたスクリーニングによる核局在性化合物の取得^[2-5d]

2.1.2 タンパク質タグを用いた小分子蛍光プローブの核局在化戦略

生細胞の核内に小分子蛍光プローブを導入するアプローチとして、タンパク質タグを用いたラベル化システムが報告されている（図 5）。この手法では、小分子リガンドに特異的に結合するタンパク質タグに核移行シグナル(nuclear localization signal, NLS)を連結した人工タンパク質設計し、細胞に発現させる。核局在化させる蛍光プローブには、タンパク質タグに特異的に結合する小分子リガンドを連結する。その後、リガンド連結蛍光プローブを細胞培養液に添加することで、核局在化したタンパク質タグに対してラベル化反応が進行し、蛍光プローブの核局在化が達成される。Kai らは、*O*⁶-alkylguanine-DNA transferase を改変することで開発した SNAP タグに NLS 配列を連結したタンパク質を細胞に発現させ、SNAP タグに選択的に結合するリガンドである *O*⁶-benzylguanine を蛍光プローブに連結することで、蛍光プローブの核局在化に成功している（図 6）^[2-6]。さらに、Kai らは SNAP タグの基質認識能を改変し、*O*⁶-benzylcytosine に対する特異的ラベル化が可能な CLIP タグを開発し、SNAP タグと CLIP タグの併用により 2 種類の蛍光プローブによる多重染色が可能であることを実証している（図 7）^[2-7]。また、SNAP/CLIP タグと直交性を有するラベル化システムとして、Haloalkane dehalogene の変異体である Halo タグを用いた手法が報告されている（図 8）^[2-8]。これらタンパク質タグラベル化を用いた手法は、基質となるリガンド分子を蛍光プローブに連結するというシンプルなアプローチにより蛍光プローブの核局在化を達成できる高い汎用性を有しており、さまざまな蛍光プローブの核局在化法として広く用いられている。

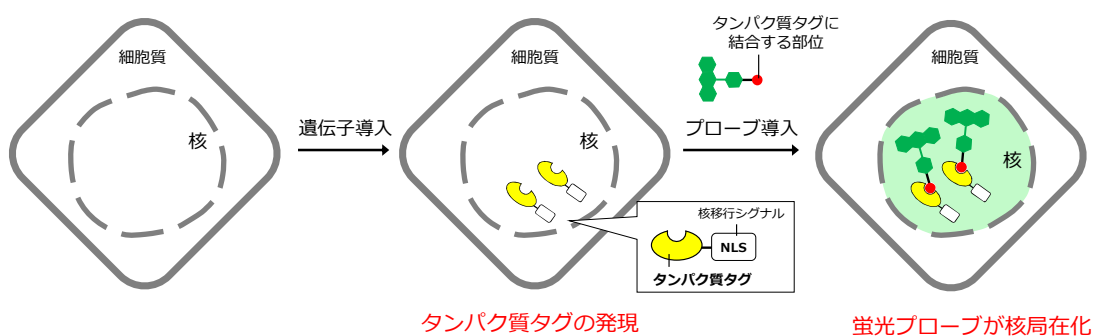


図 5 タンパク質タグラベル化法を利用した小分子蛍光プローブの核局在化の概略図

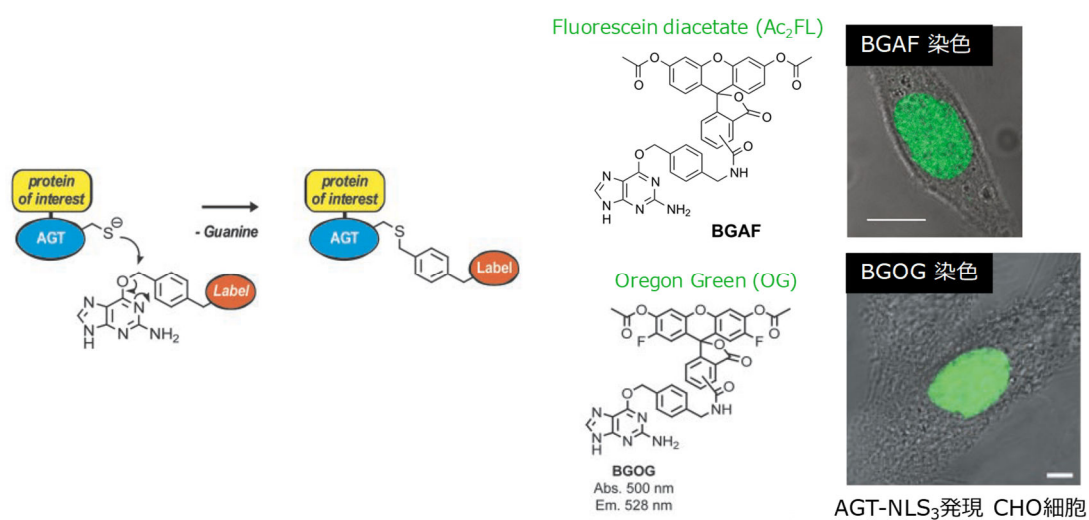


図 6 SNAP タグ (AGT タグ) ラベル化を用いた蛍光プローブの核局在化^[2-6]

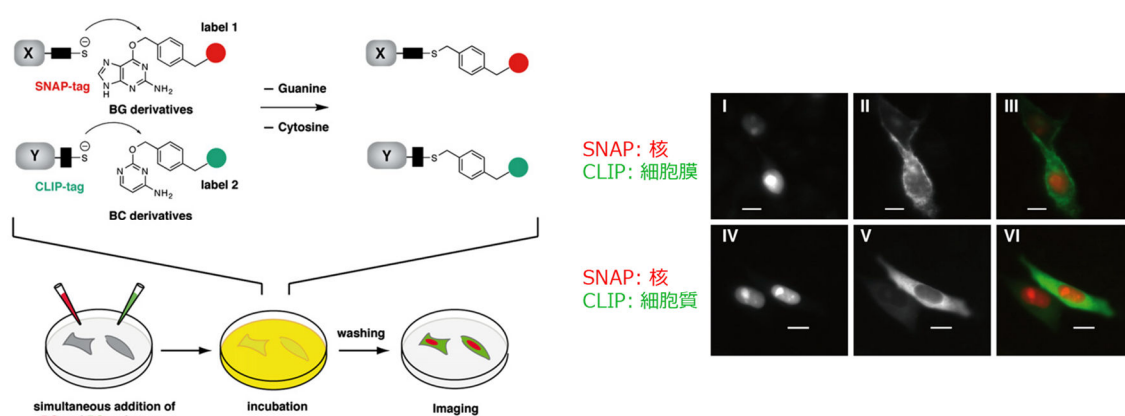


図 7 SNAP タグと CLIP タグを用いたラベル化による異なる細胞内区画領域の染め分け^[2-7]

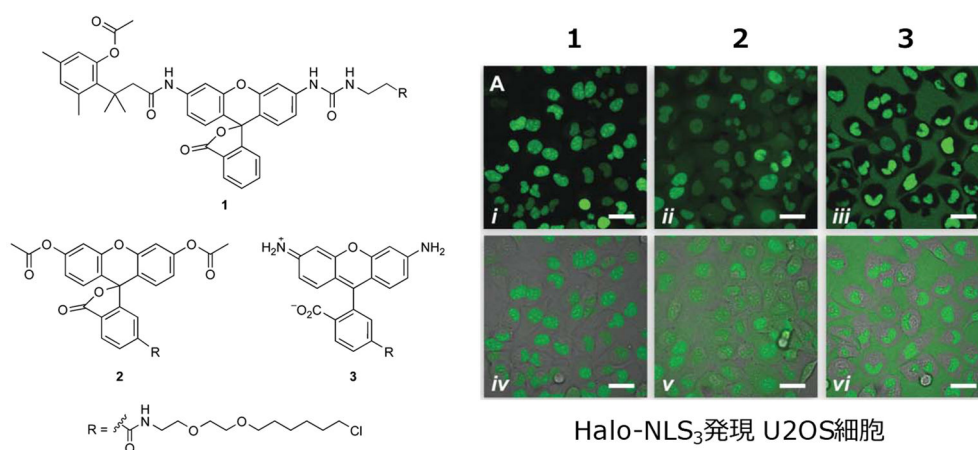


図 8 Halo タグを用いた蛍光プローブの核局在化^[2-8]

2.2 核局在性小分子蛍光プローブの合理的設計法の確立の意義

2.1.1 項で記した誘導体探索やライブラリスクリーニングは、核局在性蛍光プローブの取得に有用なアプローチである。しかし、その開発は容易なものではなく、化合物ライブラリーを構築し、その膨大な候補の中から核局在性蛍光プローブを見つけ出す必要がある。さらに、スクリーニングにより取得した核局在性蛍光プローブの光化学特性や局在化メカニズムは、取得後に初めて明らかにできるものとなるため、予めその特性を設計することは極めて困難である。2.1.2 項で示したタンパク質タグを用いた手法は、遺伝導入によるタンパク質タグの発現を必要とするため、初代細胞や組織・個体といった遺伝子導入効率の低い対象への適用が難しいという技術的な問題がある。これらの問題を同時に解決するためには化合物単独で核局在化する蛍光プローブを合理的に設計する戦略が必要不可欠である。しかし、核局在性蛍光プローブを合理的に開発するため設計法は、未だ確立されていない。そこで本研究では、核局在性蛍光プローブを合理的かつ汎用的に設計・合成するための分子設計基盤の確立とそれを用いた細胞核選択的染色技術の開発を目指した。

2.3 基本戦略：Hoechst 連結による小分子蛍光分子プローブの核局在化

2.3.1 分子設計戦略

筆者は、核内が DNA を格納するオルガネラであることに着目し、DNA 結合性の化合物である Hoechst を核局在化タグとして任意の蛍光プローブに連結する「Hoechst 連結法」を着想した。筆者らは、小分子リガンドである trimethoprim (TMP) にリンカーを介してこの Hoechst を連結することで核局在性を付与することに成功している^[2-9]。この Hoechst 連結 TMP (**hoeTMP**) は、化合物単独で細胞膜を透過し、Hoechst タグと核内 DNA との結合を介して TMP の核局在化を達成する (図 9)。そこで、本研究では、この Hoechst を既存のさまざまな蛍光波長をもつ小分子蛍光色素 (図 10) にモジュール的に連結することで、局在性を持たないさまざまな蛍光プローブに核局在性を付与できるものと考えた (図 11)^{[2-1][2-10]}。

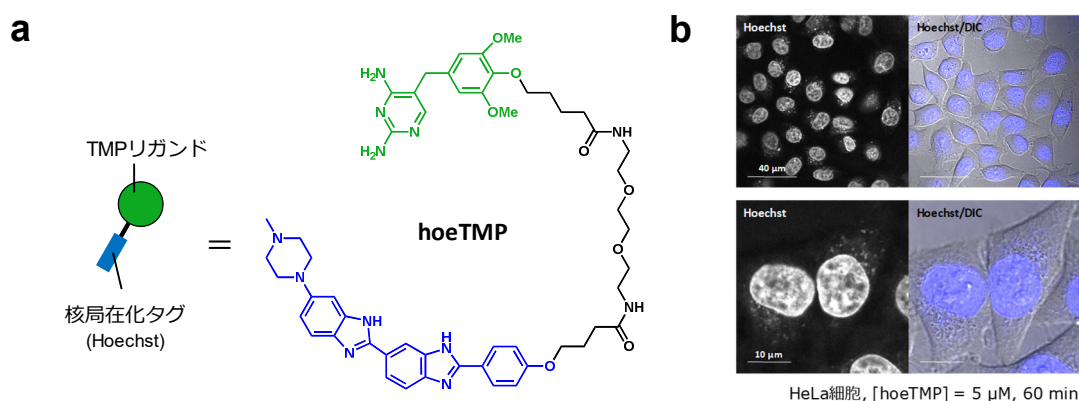


図 9 Hoechst 連結法による小分子リガンド化合物の核局在化^[2-9], (a) **hoeTMP** の分子構造, (b) 共焦点レーザー顕微鏡観察像; **hoeTMP** の生細胞への導入結果

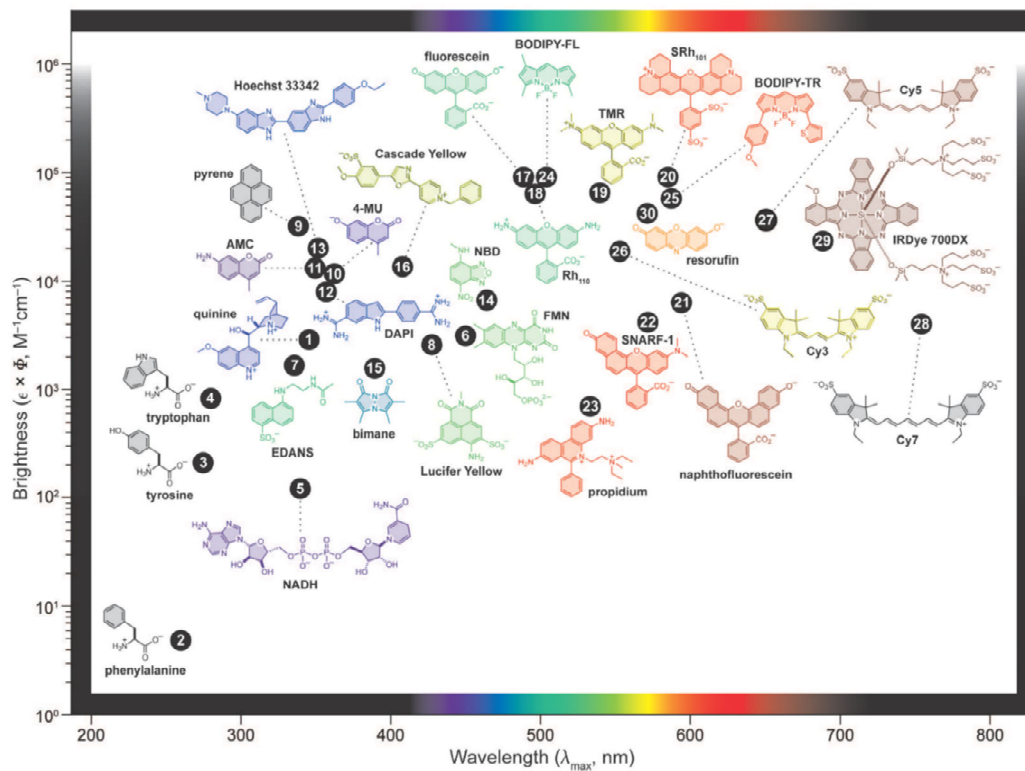


図 10 既報のさまざまな波長・骨格の蛍光プローブ^[2-1]

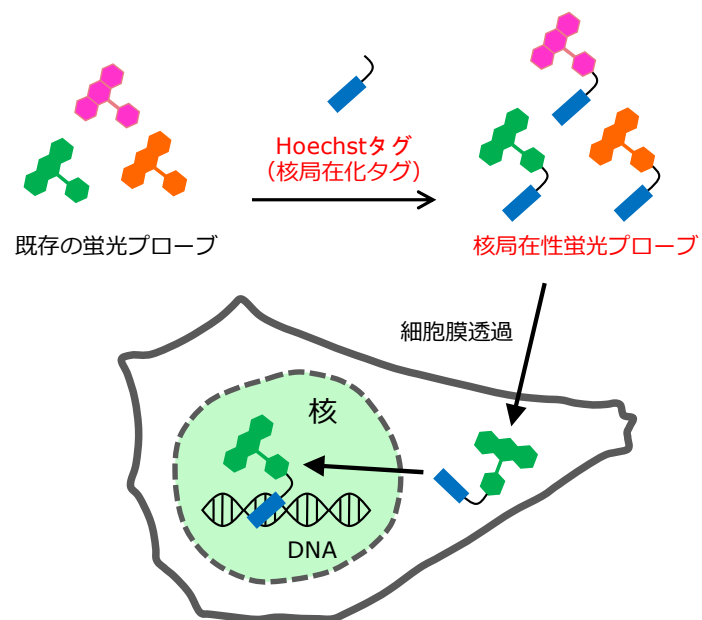


図 11 Hoechst 連結法による小分子蛍光色素の核局在化戦略

2.4 結果

2.4.1 Hoechst 連結 fluorescein の設計と特性評価

2.3 項で示した核局在性分子の設計戦略を実現するに当たり、まずは古典的な緑色蛍光色素として知られる fluorescein (FL)に Hoechst を連結した **hoeFL** を設計・合成した (図 12a)。まず **hoeFL** の DNA 結合能や光化学特性を *in vitro* で評価した。緩衝液に **hoeFL** を溶解させ、Hoechst に結合することが知られている hairpin 型 double strand DNA (hpDNA)(図 12b, c, e) [2-11]を添加し、FL 骨格の蛍光強度変化を調べた ($\lambda_{\text{ex}}=460\text{ nm}$)。その結果、**hoeFL** は hpDNA との結合により蛍光強度が約 94 倍に増大する turn-on 型の蛍光プローブであることが明らかとなった。さらに、**hoeFL** と hpDNA の結合が 1:1 であると仮定し、hpDNA 結合に伴う蛍光強度の増大に対してフィッティングを行うことで、**hoeFL** の hpDNA に対する解離定数 (K_D) を導出した (図 12c)。その結果、**hoeFL** は hpDNA に対して $K_D=2.5\text{ }\mu\text{M}$ で結合することが明らかとなった。この **hoeFL** と hpDNA の結合は、フリーの Hoechst (Hoechst 33342)の添加により競合阻害された (図 12d)。また、Hoechst にリンカーのみを連結した **hoeBoc** (図 13c)も **hoeFL** と同様に hpDNA に結合することが明らかとなった (図 14)。これらの結果より、**hoeFL** は Hoechst 部位を介して DNA に結合する蛍光プローブであることが明らかとなった。

次に、**hoeFL** の hpDNA 結合による蛍光強度増大のメカニズムについて検討した。hpDNA 添加前の **hoeFL** の吸収スペクトルのピークは 338 nm と 501 nm であるが、hpDNA を添加後ではピークの波長シフトが見られた (図 13a)。hpDNA 添加前の **hoeFL** の 501 nm 吸収ピークは、hpDNA 添加に伴い 495 nm へブルーシフトした。この 495 nm の吸収ピークは、FL にリンカーを連結した **FL-Boc** (図 13d) の吸収ピークと一致した (図 13b)。したがって、hpDNA 添加前は、**hoeFL** の Hoechst 部位と FL 部位が相互作用し、FL 蛍光が消光していることが示唆された (図 13e)。この蛍光色素同士の相互作用による消光は、2 種類の蛍光プローブを柔軟なリンカーで接続した化合物でよく見られる現象であり、今回のように Hoechst と FL を柔軟な ethylene glycol リンカーで連結した **hoeFL** においても同様の現象が起きるものと考えられる [2-13]。また、**hoeFL** の Hoechst 由来の吸収ピークは、hpDNA との結合により 338 nm から 351 nm へレッドシフトした。この 351 nm の吸収ピークは、hpDNA に結合した **hoeBoc** の吸収ピークと一致した (図 13b)。以上の結果より、DNA 結合前の **hoeFL** は、Hoechst 部位と FL 部位が相互作用することで FL 蛍光が消光しており、**hoeFL** が Hoechst 部位を介して hpDNA に結合することで Hoechst 部位と FL 部位の相互作用が解消し、FL の蛍光強度が増大 (回復) するという一連のメカニズムが示唆された (図 13e)。また、**hoeFL** の hpDNA 結合による蛍光増大は、目視でも確認できた (図 13f)。

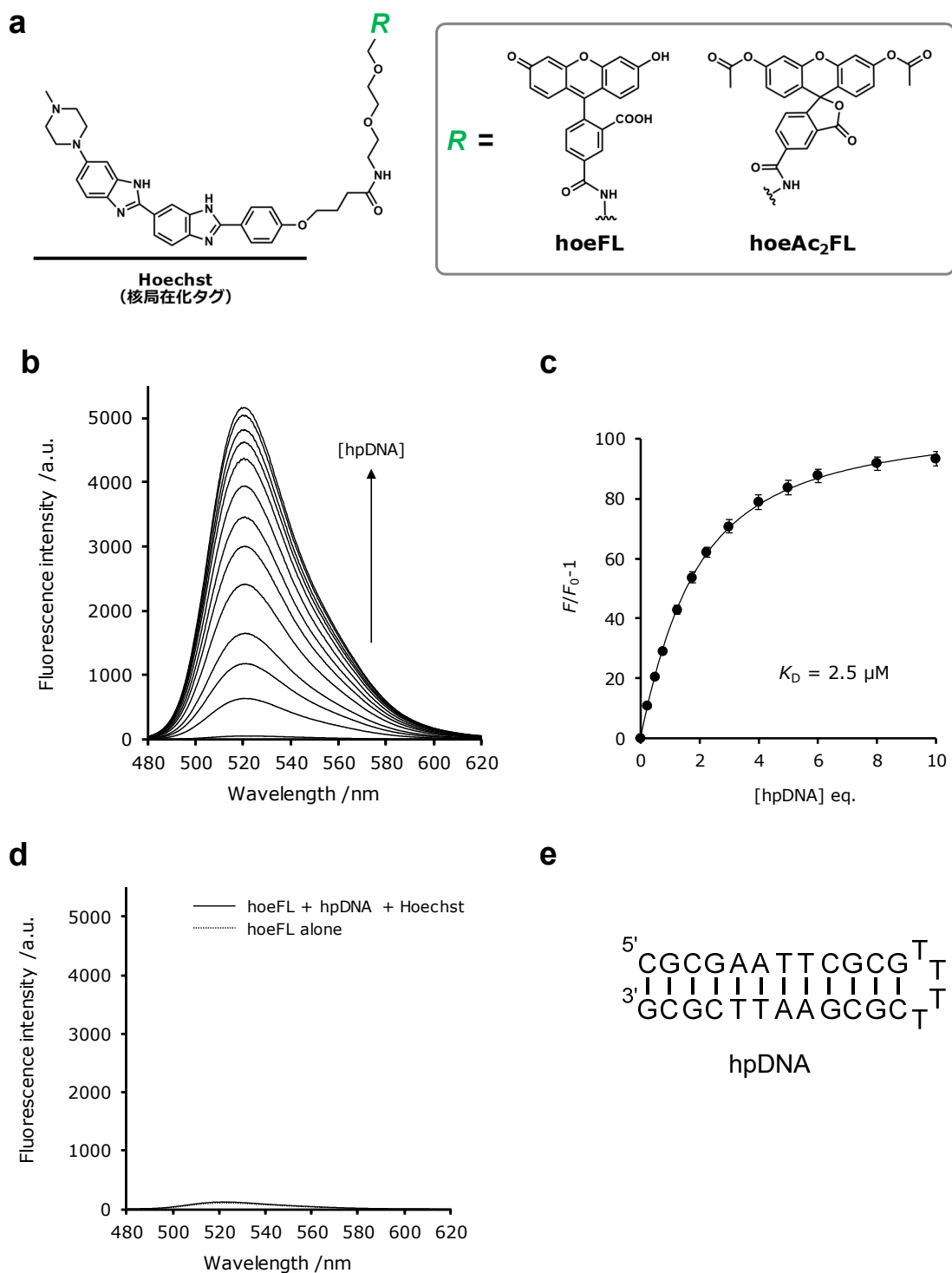


図 12 Hoechst 連結 fluorescein (**hoeFL**) の光化学特性の評価; (a) **hoeFL**, **hoeAc₂FL** の分子構造, (b) **hoeFL** の hpDNA 結合時の蛍光応答特性 (2 μM **hoeFL**, 0-20 μM hpDNA, $\lambda_{\text{ex}} = 460 \text{ nm}$), (c) **hoeFL** の hpDNA 結合に伴う 520 nm の蛍光強度増大に対するフィッティング ($n = 3$, mean \pm s.d.), (d) Hoechst 33342 を用いた競合阻害 (2 μM **hoeFL**, $\pm 20 \mu\text{M}$ hpDNA, 40 μM Hoechst 33342, $\lambda_{\text{ex}} = 460 \text{ nm}$), (e) hpDNA の配列^[2-11]

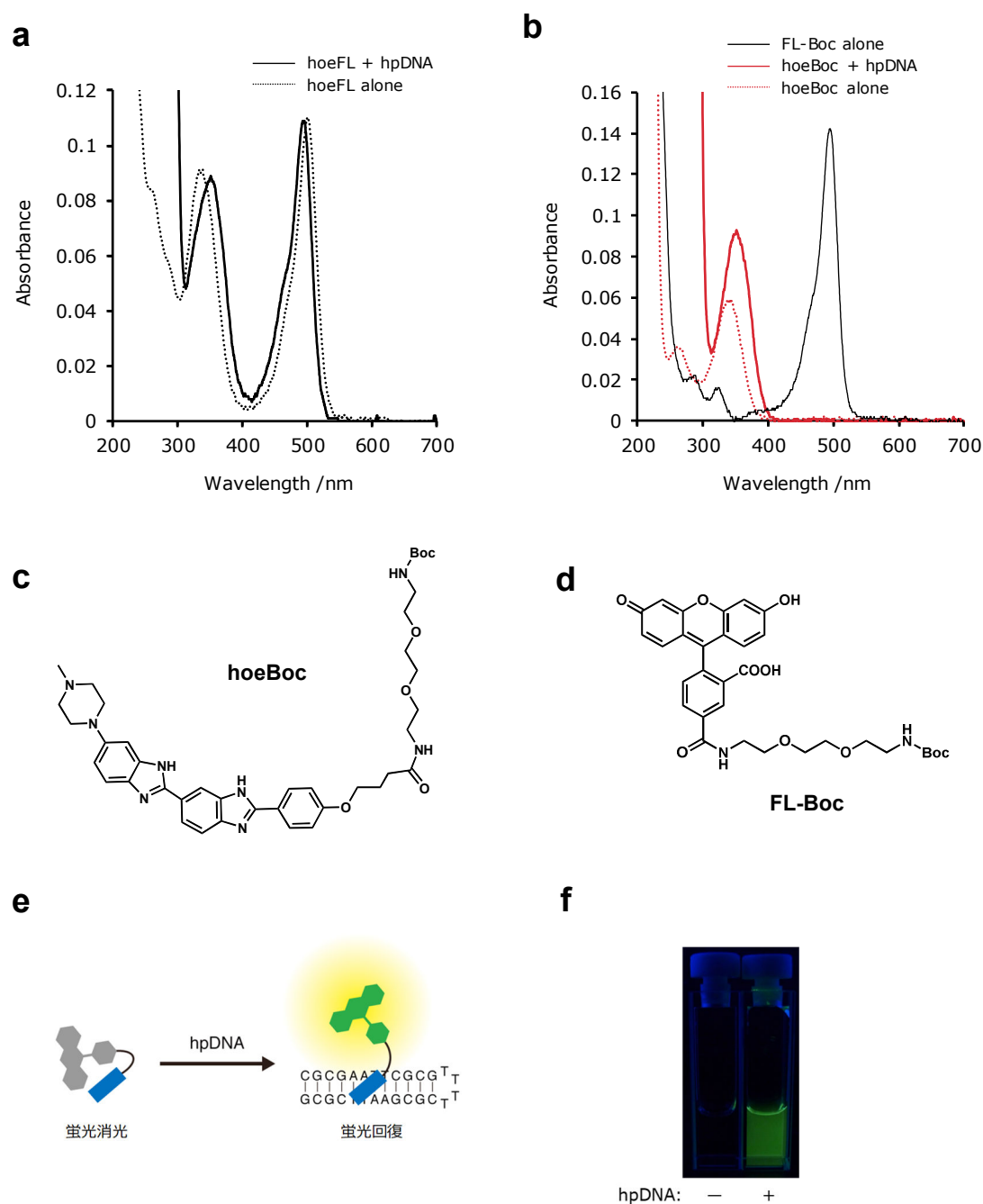


図 13 hoeFL の蛍光強度増大メカニズム検討; (a) hoeFL の吸収スペクトル (2 μ M hoeFL, ± 20 μ M hpDNA) , (b) hoeBoc と FL-Boc の吸収スペクトル (2 μ M hoeBoc, ± 20 μ M hpDNA (red line), 2 μ M FL-Boc (black line)), (c) hoeBoc の分子構造, (d) FL-Boc の分子構造, (e) hoeFL の hpDNA 結合による蛍光強度増大メカニズムの概略図, (f) hpDNA 添加前後の hoeFL 蛍光の比較写真 (UV lamp 照射, 2 μ M hoeFL, ± 20 μ M hpDNA)

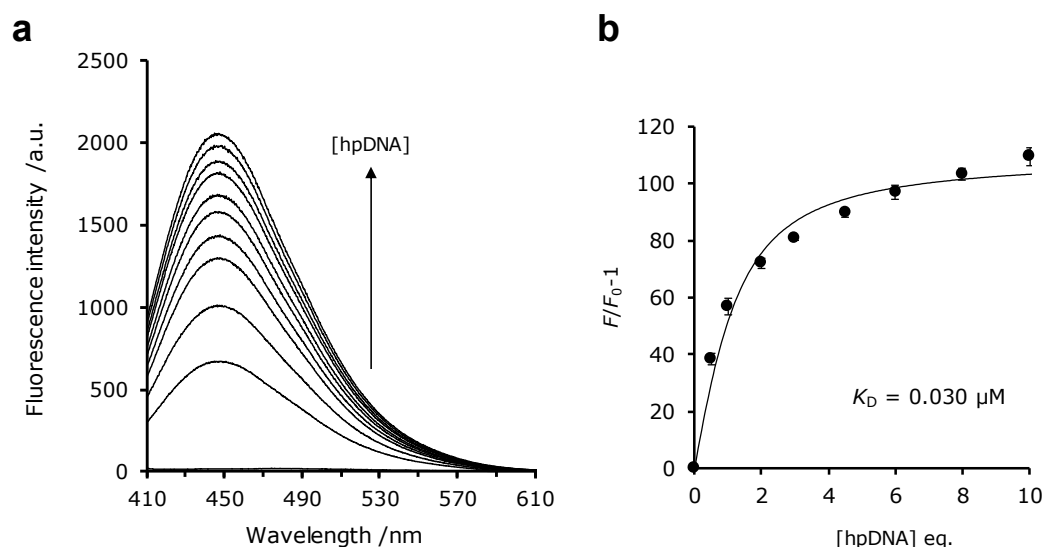


図 14 hoeBoc の光化学特性の評価; (a) hoeBoc の hpDNA に対する蛍光応答特性 (50 nM hoeBoc, 0-0.5 μ M hpDNA, $\lambda_{\text{ex}} = 350$ nm), (b) hpDNA 濃度に伴う 447 nm 蛍光強度増大に対するフィッティング ($n = 3$, mean \pm s.d.)

細胞実験

細胞実験を行うに当たり、fluorescein (FL) 骨格の細胞膜透過性は低いため、細胞実験用に FL の水酸基をアセチル化した fluorescein diacetate (Ac_2FL) を用いた **hoeAc₂FL** を別途設計・合成した (図 12a)。 Ac_2FL 骨格は無蛍光性であるが、細胞内では esterase による加水分解を受けることで蛍光性の FL 骨格に変換される^[2-13]。これにより Ac_2FL は疎水的で膜透過性は高いが、細胞内で FL に変換されることで親水性が高まり細胞全体を拡散することが可能となる^{[2-8b] [2-13]}。

hoeAc₂FL の核局在化能を HeLa 細胞 (ヒト子宮頸癌細胞) を用いたライブセルイメージングにより評価した。**hoeAc₂FL** を細胞培養液に 5 μ M で添加し 15 min インキュベーションを行い、洗浄操作の後に共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞を観察した。蛍光観察時は、FL 部位を青色レーザー (488 nm) で励起し、FL 由来の緑色蛍光 (500-600 nm) を検出した。またコントロール実験として、Hoechst を連結していない Ac_2FL を導入した細胞を用意した。観察結果を図 15 に示した。DNA 結合能を持たない Ac_2FL を用いた場合では、HeLa 細胞の全体から緑色蛍光が検出された (図 15a)。一方で、**hoeAc₂FL** を用いた場合では、HeLa 細胞の核内選択的に緑色蛍光が検出され、Hoechst 連結による FL の核局在化に成功した (図 15b)。また、Hoechst 33342 との共染色により、**hoeAc₂FL** の細胞内の局在化先が、従来の Hoechst と変わらないことを確認した (図 16)。また、**hoeAc₂FL** は、添加濃度を 0.1 - 20 μ M の範囲で増減させた場合においても核局在化を達成し、非特異的な局在化は確認されなかった (図 17)。これらの結果は、**hoeAc₂FL** が細胞膜を透過後、細胞内で **hoeFL** に変換されることで、核内 DNA と高効率的に結合していることを示している。**hoeAc₂FL** 添加時と同じ条件で **hoeFL** を細胞に添加することで核局在化が達成できるかを評価した。**hoeFL** は、細胞膜透過性が低く、細胞内への導入に **hoeAc₂FL** よりも長

いインキュベーション時間 (60 min) を必要としたが、**hoeAc₂FL** と同様に核局在化した (図 18)。

これら **hoeFL** / **hoeAc₂FL** の観察条件を検討した結果、**hoeAc₂FL** を用いた FL 蛍光による核染色は、洗浄操作を行わない条件においても高効率な核染色を達成できた (図 18)。一方で、**hoeFL** を用いた場合では、核内以外に細胞培養液でバックグランドシグナルが検出された (図 18)。

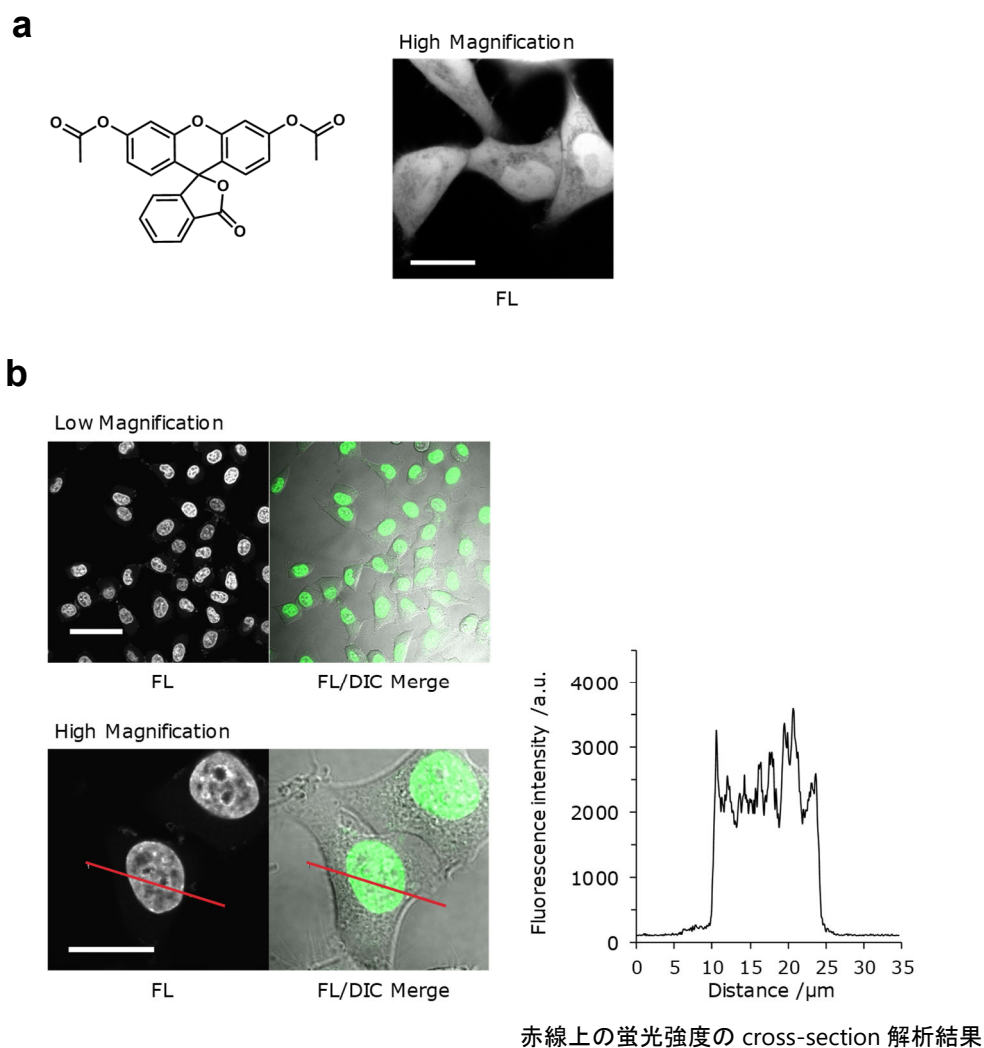


図 15 HeLa 細胞を用いた **hoeAc₂FL** の核局在化能の評価; (a) **Ac₂FL** の細胞内局在評価 (2 μ M **Ac₂FL**, 15 min incubation), (b) **hoeAc₂FL** の細胞内局在評価 (5 μ M **hoeAc₂FL**, 15 min incubation), 共焦点レーザー顕微鏡観察; Ex. 488 nm, Em. 500-600 nm, scale bar = 20 μ m

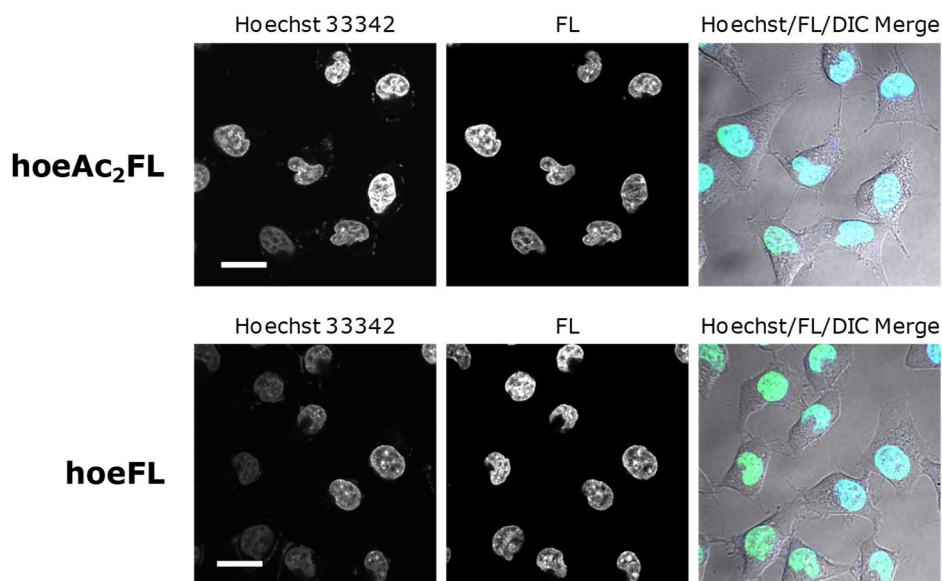


図 16 HeLa 細胞を用いた Hoechst 33342 と **hoeAc₂FL** / **hoeFL** の共染色 (5 μ M **hoeAc₂FL**, 1 μ M Hoechst 33342, 15 min incubation (top), 5 μ M **hoeFL**, 1 μ M Hoechst 33342, 60 min incubation (bottom)) ,共焦点レーザー顕微鏡観察; Hoechst channel: Ex. 405 nm, Em 425-475 nm, FL channel: Ex. 488 nm, Em. 512-600 nm , scale bar = 20 μ m

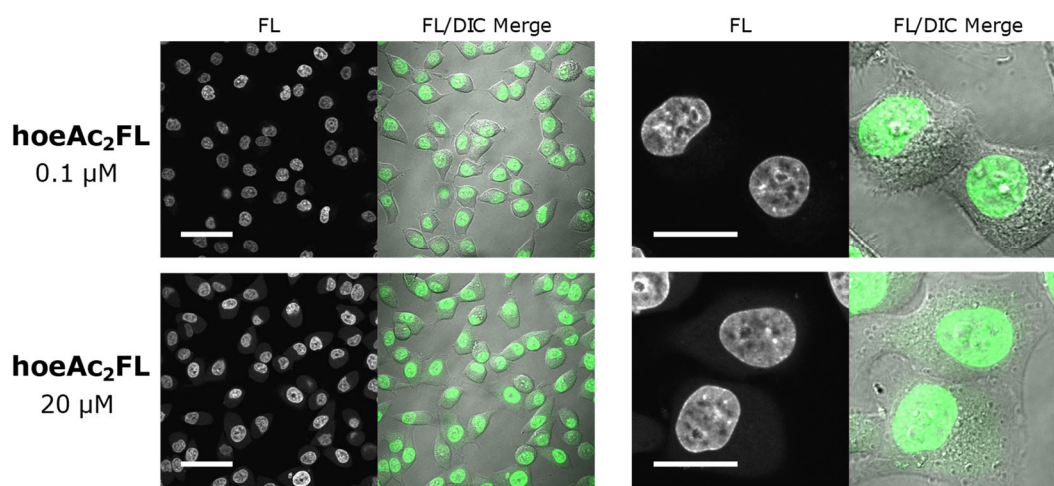


図 17 HeLa 細胞を用いた **hoeAc₂FL** の添加濃度変更時の核局在化能への影響評価 (0.1 or 20 μ M **hoeAc₂FL**, 15 min incubation) ,共焦点レーザー顕微鏡観察; Ex. 488 nm, Em. 500-600 nm, scale bar = 20 μ m

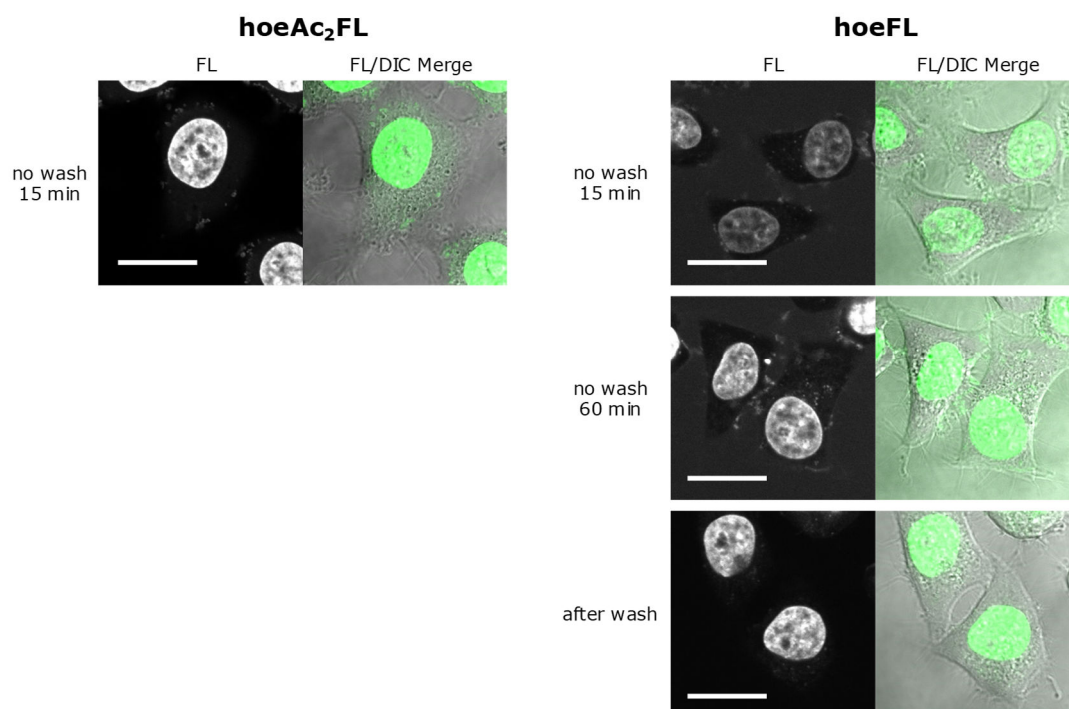


図 18 HeLa 細胞を用いた **hoeAc₂FL** と **hoeFL** の観察条件の検討 (5 μ M **hoeAc₂FL** or **hoeFL**) , 共焦点レーザー顕微鏡観察; Ex. 488 nm, Em. 500-600 nm, scale bar = 20 μ m

hoeAc₂FL のさまざまな細胞株・組織への適用

hoeAc₂FL の核染色剤としての汎用性を調べるために、由来や特性の異なるさまざまな細胞株 (HeLa, NIH3T3, C2C12, HEK293, PC12, Jurkat) を対象に核染色が達成できるかを評価した。その結果 **hoeAc₂FL** は、いずれの細胞株において明確な核局在化を示し、**hoeAc₂FL** が核染色剤としての高い汎用性を有していることを実証できた (図 19)。さらに **hoeAc₂FL** は、非固定のラット海馬組織においても明確な核局在化を示し、**hoeAc₂FL** が生きた細胞組織の核染色にも適用できることが明らかとなった (図 20)。

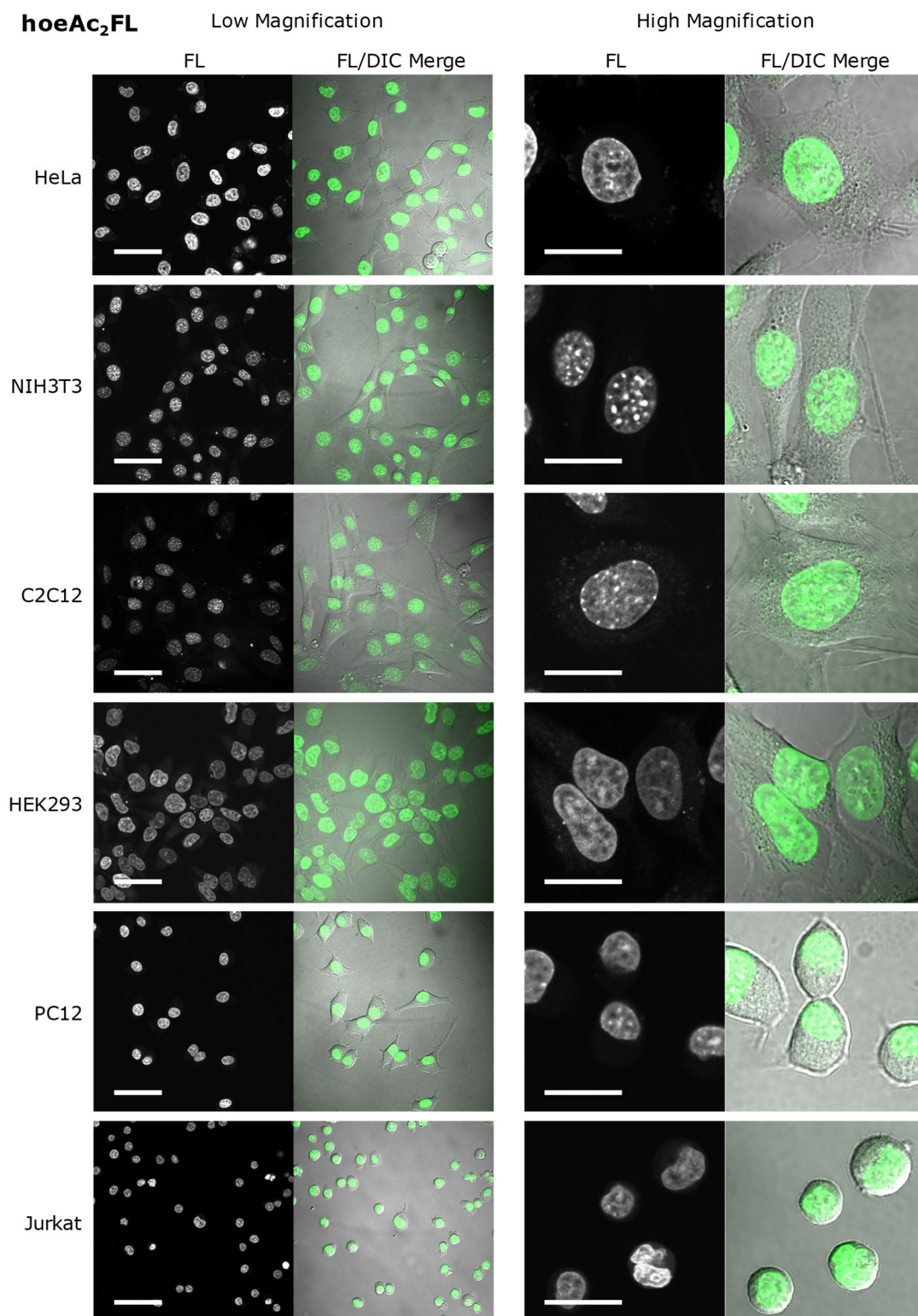


図 19 **hoeAc₂FL** を用いたさまざまな細胞株の核染色結果 (1 μ M **hoeAc₂FL** or **hoeFL**, 15 min incubation) , 共焦点レーザー顕微鏡観察; Ex. 488 nm, Em. 500-600 nm, scale bar = 20 μ m

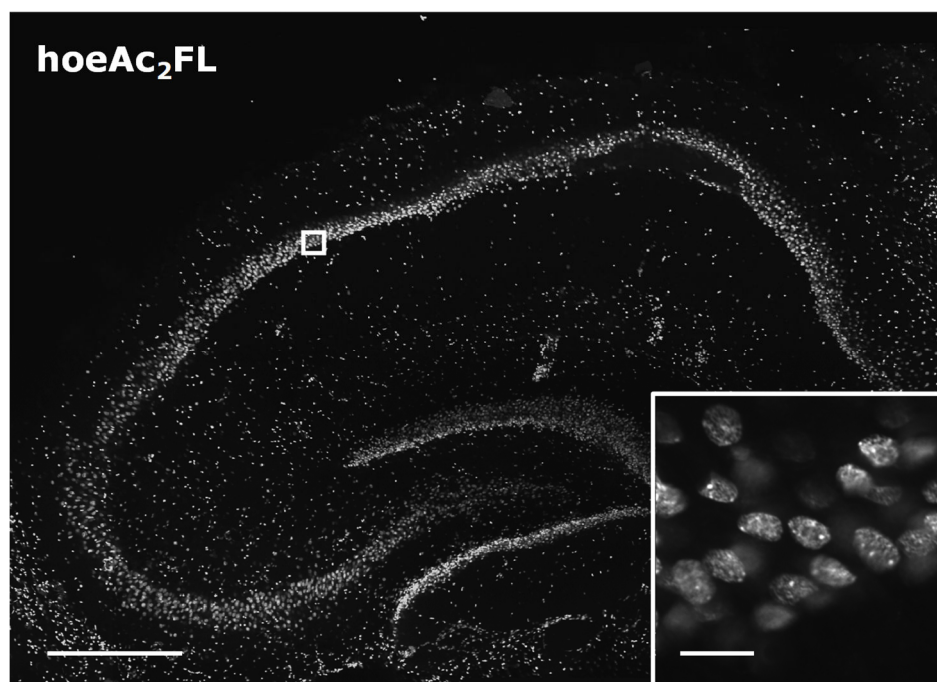
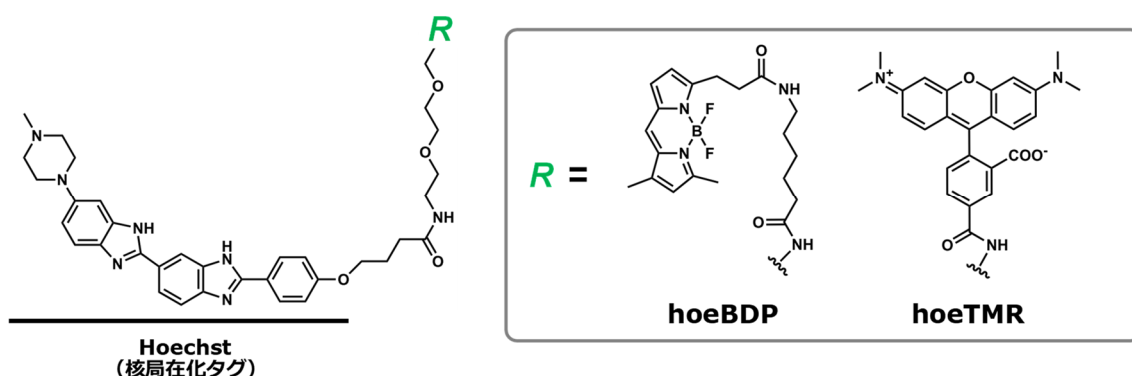


図 20 **hoeAc₂FL** を用いたラット海馬スライス核染色結果 (20 μ M **hoeAc₂FL**, 90 min incubation) , 共焦点レーザー顕微鏡観察; Ex. 488 nm, Em. 500-600 nm, scale bar = 500 nm (main image) and 20 nm (inset)

2.4.2 Hoechst 連結法の汎用性の評価

2.4.1 項では、Hoechst を FL に連結することで FL に核局在性を付与できることを実証した。本項では、Hoechst 連結法の汎用性を評価するために、FL とは構造の異なる蛍光プローブである BODIPY (BDP) と tetramethylrhodamine (TMR) に Hoechst を連結することで、**hoeBDP**, **hoeTMR** を新規設計・合成した (図 21)。**hoeBDP** と **hoeTMR** の光化学特性や DNA 結合能、核局在化能は、**hoeFL** / **hoeAc₂FL** と同様の方法で評価した (図 22)。まず、**hoeBDP** と **hoeTMR** に hpDNA を添加した際の蛍光応答特性を評価した。その結果、**hoeBDP** と **hoeTMR** はいずれも、hpDNA の添加に伴い蛍光強度が増大する turn-on 型の蛍光プローブであることが明らかとなった (図 22a-b, 図 23a-b)。**hoeBDP** と **hoeTMR** の hpDNA に対する K_D は、**hoeFL** と同様の方法で導出することで、**hoeBDP**: $K_D = 0.028 \mu\text{M}$, **hoeTMR**: $K_D = 1.8 \mu\text{M}$ と決定できた (図 22b, 図 23b)。また、**hoeBDP** / **hoeTMR** の hpDNA 添加前後の吸収スペクトルを比較したところ、**hoeFL** と同様に hpDNA 添加前後で吸収スペクトルが顕著に変化することを確認した (図 22d, 図 23d)。これらの結果より、**hoeBDP** / **hoeTMR** は、DNA 結合能を有しており、**hoeFL** と同様のメカニズムで蛍光回復していると考えられる (図 13e)。この hpDNA 添加に伴う **hoeBDP** と **hoeTMR** の蛍光強度の増大は、目視でも確認できた (図 22e, 図 23e)。また、**hoeBDP** / **hoeTMR** の hpDNA 結合に伴う蛍光強度の増大は、Hoechst 33342 の添加で競合阻害された (図 22c, 図 23c)。本研究で開発した Hoechst 連結蛍光プローブ (**hoeAc₂FL**, **hoeBDP**, **hoeTMR**) の hpDNA 添加に伴う蛍光強度比変化と蛍光量子収率は、表 1 にまとめた。これらの結果より、**hoeBDP** / **hoeTMR** は、**hoeFL** と同様に Hoechst 部位を介して hpDNA に結合していることが明らかとなった。

図 21 **hoeBDP** / **hoeTMR** の分子構造

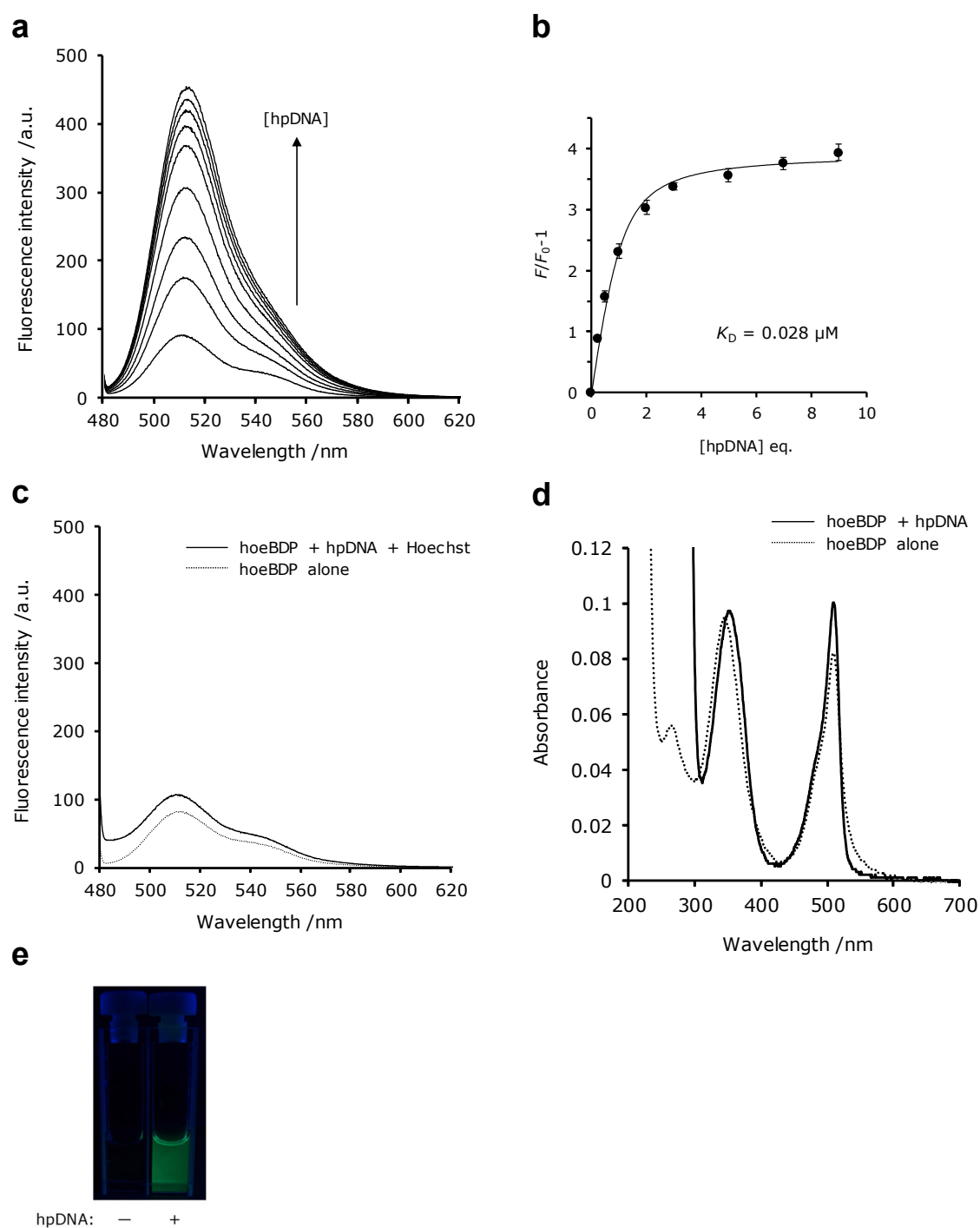


図 22 hoeBDP の光化学特性の評価; (a) **hoeBDP** の hpDNA 結合時の蛍光応答特性 (0.1 μM **hoeBDP**, 0-0.9 μM hpDNA, $\lambda_{\text{ex}} = 460 \text{ nm}$) , (b) **hoeBDP** の hpDNA 結合に伴う 514 nm の蛍光強度増大に対するフィッティング ($n = 3$, mean \pm s.d.), (c) Hoechst 33342 を用いた競合阻害 (0.1 μM **hoeBDP**, $\pm 0.9 \mu\text{M}$ hpDNA, 10 μM Hoechst 33342, $\lambda_{\text{ex}} = 460 \text{ nm}$) , (d) hpDNA 添加前後の **hoeBDP** の吸収スペクトル (2 μM **hoeBDP**, $\pm 8 \mu\text{M}$ hpDNA) , (e) hpDNA 添加前後の **hoeBDP** 蛍光の比較写真 (UV lamp 照射; 2 μM **hoeBDP**, $\pm 8 \mu\text{M}$ hpDNA)

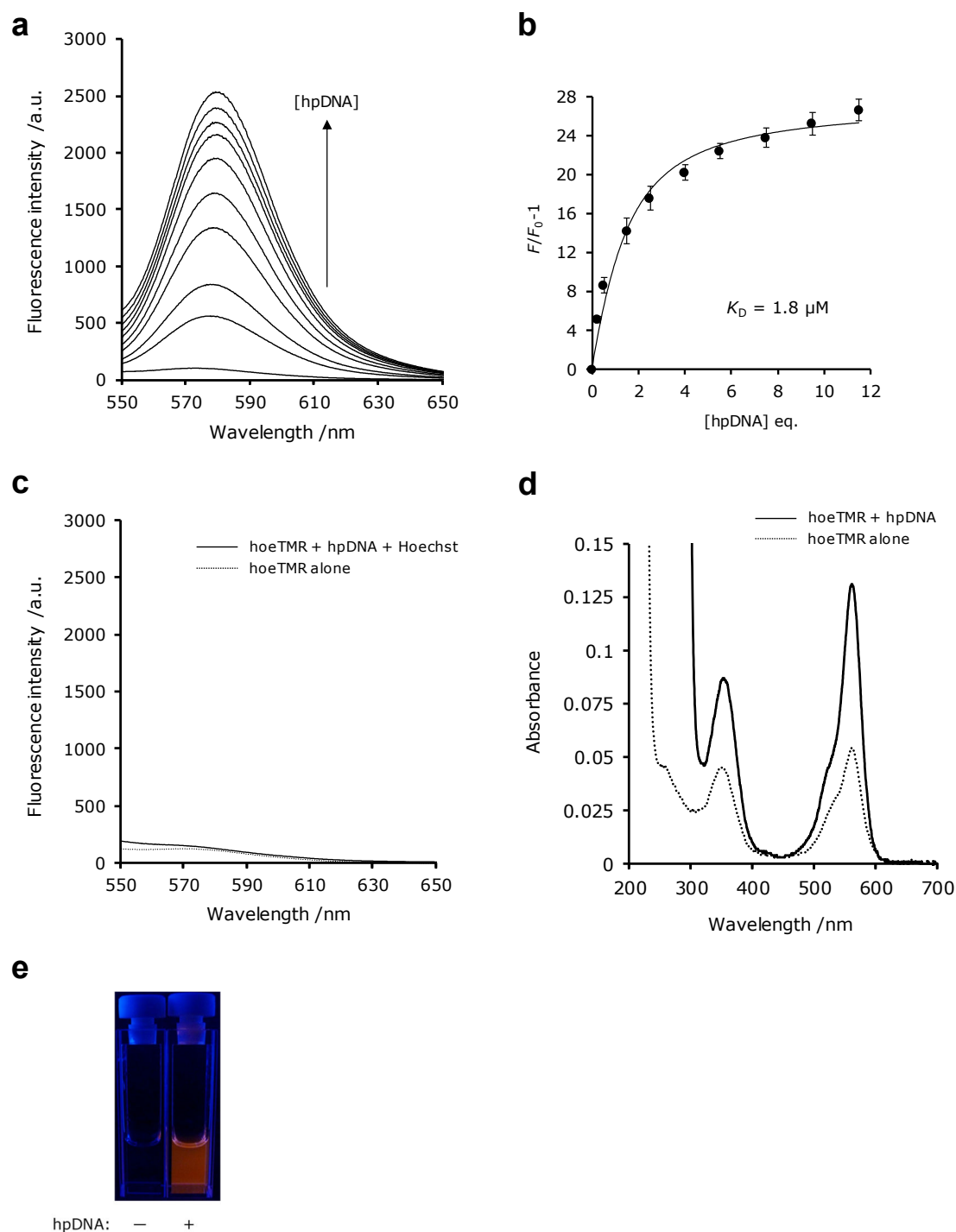


図 23 hoeTMR の光化学特性の評価; (a) **hoeTMR** の hpDNA 結合時の蛍光応答特性 (2 μM **hoeTMR**, 0-23 μM hpDNA, $\lambda_{\text{ex}} = 500 \text{ nm}$) , (b) **hoeTMR** の hpDNA 結合に伴う 580 nm の蛍光強度増大に対するフィッティング($n = 3$, mean \pm s.d.), (c) Hoechst 33342 を用いた競合阻害 (2 μM **hoeTMR**, $\pm 23 \mu\text{M}$ hpDNA, 40 μM Hoechst 33342, $\lambda_{\text{ex}} = 500 \text{ nm}$) , (d) hpDNA 添加前後の **hoeTMR** の吸収スペクトル (2 μM **hoeTMR**, $\pm 27 \mu\text{M}$ hpDNA) , (e) hpDNA 添加前後の **hoeTMR** 蛍光の比較写真 (UV lamp 照射; 2 μM **hoeTMR**, $\pm 27 \mu\text{M}$ hpDNA)

表 1 Hoechst 連結蛍光プローブの hpDNA 結合による蛍光強度比変化と蛍光量子収率

Probes	F/F_0	Φ_{probe}	$\Phi_{\text{probe-hpDNA}}$
hoeFL	94	0.0072	0.44
hoeBDP	4.9	0.024	0.23
hoeTMR	27	0.0078	0.089

細胞実験

hoeBDP / hoeTMR の核局在化能を HeLa 細胞を用いて評価した。**hoeTMR** は、細胞培養液中で凝集しやすいため、非イオン性界面活性剤 Pluronic F-127 (終濃度 0.02% (w/v)) を用いて凝集体形成を抑制した^[2-14]。共焦点レーザー顕微鏡観察の結果を図 24 に示した。観察の結果 **hoeBDP / hoeTMR** はいずれも明確な核局在性を示した。ただし、**hoeTMR** の細胞膜透過性は、**hoeAc2FL** や **hoeBDP** に比べ低く、1 h のインキュベーション時間を必要とした。また、**hoeTMR** は核だけでなく、一部リソソームへも局在化した。**hoeTMR** のリソソーム局在化は、マーカーとの共染色により確認した (データ非掲載)。また、**hoeBDP / hoeTMR** の主要な局在化先が、Hoechst 単独時と変わらないことを Hoechst 33342 を用いた共染色実験により確認できた (図 25)。**hoeBDP / hoeTMR** の添加濃度は、0.5–20 μM の範囲で増減させても核局在化能は保持され、**hoeBDP / hoeTMR** が、いずれも細胞内で高効率に核内 DNA に結合していることが示された (図 26)。また、**hoeBDP** のバックグラウンドシグナルは、培地中で低く抑えられており、洗浄操作なしでも核内選択的な染色を達成できることが明らかとなった (図 26)。**hoeTMR** は、洗浄操作を行わない場合では、核内だけでなく培地からも TMR 由来の蛍光が検出される一方で、細胞質の TMR 蛍光は低く抑えられていることが明らかとなった (図 26)。以上の結果より、Hoechst 連結法は、さまざまな骨格の蛍光プローブに核局在性を付与するための汎用的な分子設計基盤になるものと考えられる。

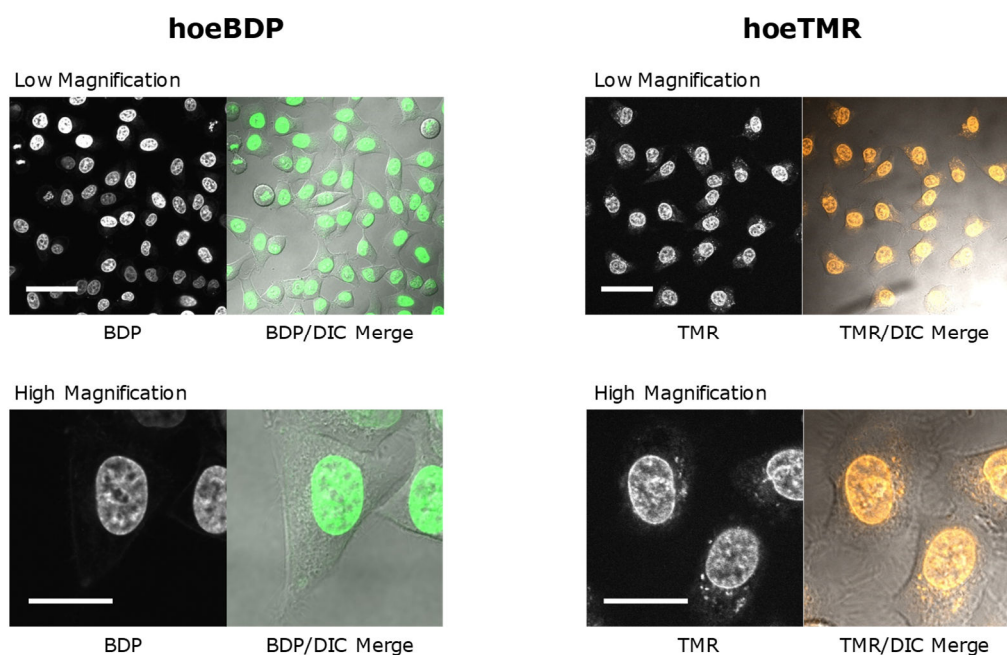


図 24 HeLa 細胞を用いた **hoeBDP** / **hoeTMR** の核局在化能の評価結果 (5 μ M **hoeBDP**, 15 min incubation (left), 5 μ M **hoeTMR** + 0.02% Pluronic F-127, 60 min incubation (right)) , 共焦点レーザー顕微鏡観察; Ex. 488 nm, Em. 500-600 nm (left), Ex. 543 nm, Em 555-655 nm (right) , scale bar = 20 μ m

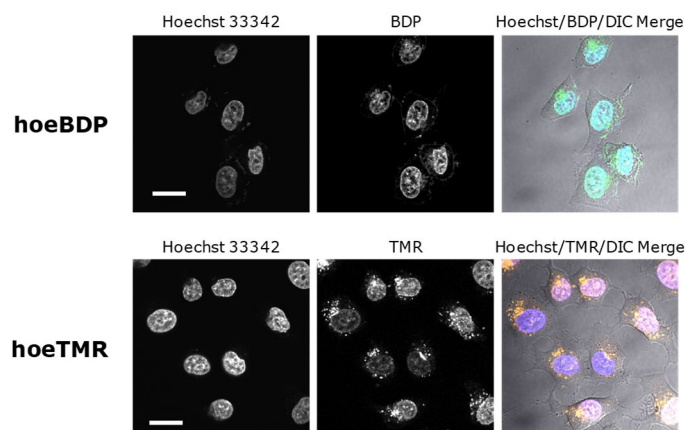


図 25 HeLa 細胞を用いた Hoechst 33342 と **hoeBDP** / **hoeTMR** の共染色結果 (5 μ M **hoeBDP**, 15 min incubation (left), 5 μ M **hoeTMR** + 0.02% Pluronic F-127, 60 min incubation (right)) , 共焦点レーザー顕微鏡観察; Hoechst channel: Ex. 405 nm, Em. 425-475 nm; BDP channel: Ex. 488 nm, Em. 525-600 nm; TMR channel; Ex. 543 nm, Em 555-655 nm, scale bar = 20 μ m

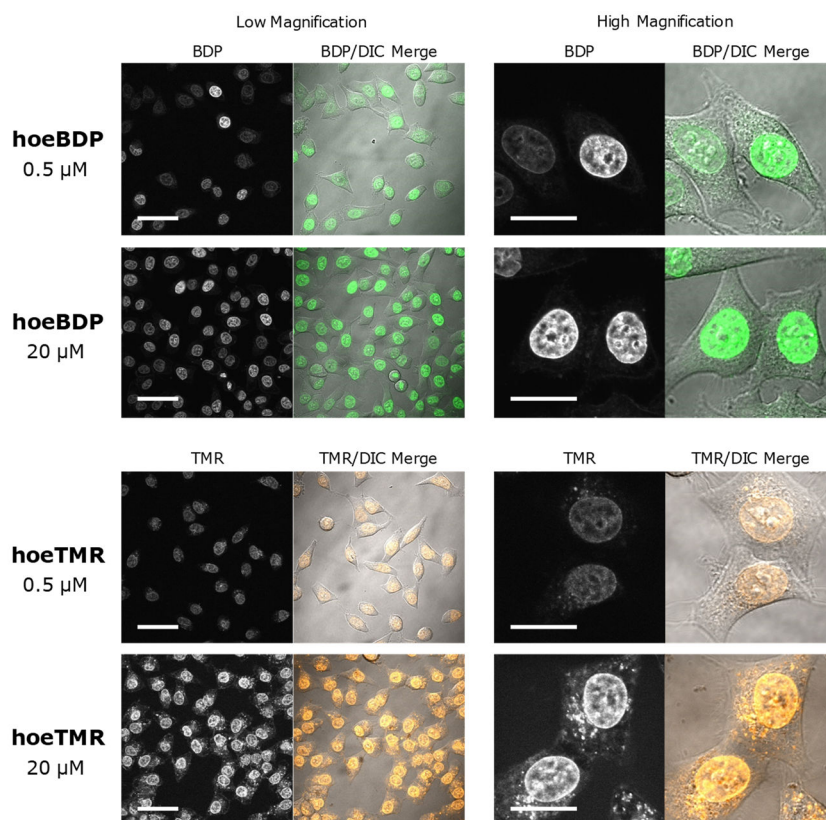


図 26 HeLa 細胞を用いた **hoeBDP** / **hoeTMR** の添加濃度変更時の核局在化能への影響評価 (5 μM **hoeBDP**, 15 min incubation (left), 5 μM **hoeTMR** + 0.02% Pluronic F-127, 60 min incubation (right)) , 共焦点レーザー顕微鏡観察; BDP channel: Ex. 488 nm, Em. 500-600 nm; TMR channel; Ex. 543 nm, Em 555-655 nm, scale bar = 20 μm

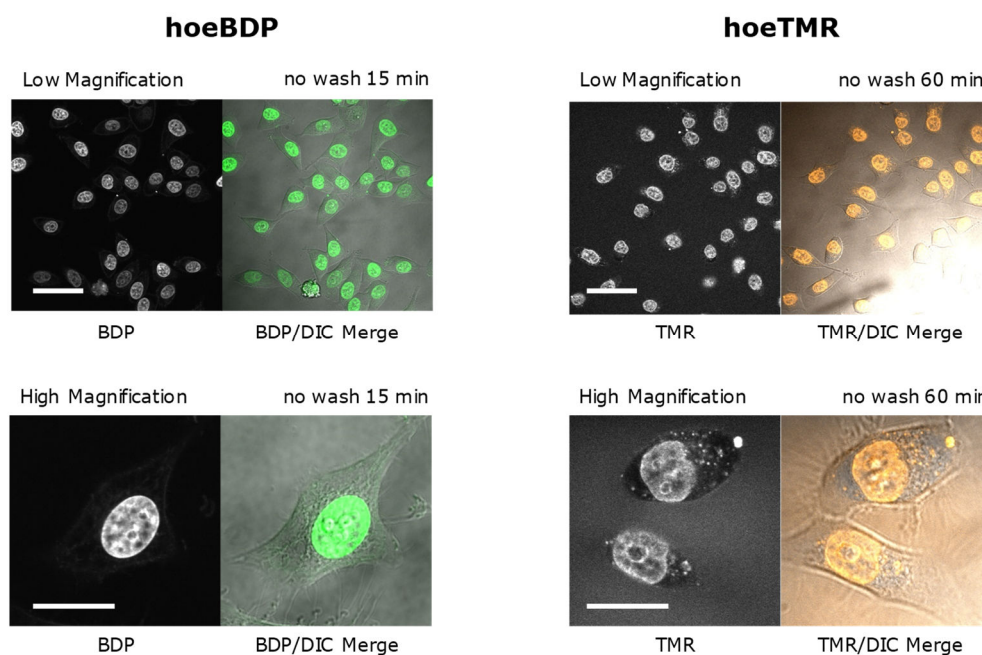


図 27 HeLa 細胞を用いた非洗浄時の **hoeBDP**, **hoeTMR** を用いた核染色状態の評価 (5 μM **hoeBDP**, 15 min incubation (left), 5 μM **hoeTMR** + 0.02% Pluronic F-127, 60 min incubation (right)) , 共焦点レーザー顕微鏡観察; BDP channel: Ex. 488 nm, Em. 500-600 nm; TMR channel; Ex. 543 nm, Em 555-655 nm, scale bar = 20 μm

2.4.3 Hoechst 連結蛍光プローブの細胞毒性の評価

2.4.1, 2.4.2 項で合成した **hoeAc₂FL**, **hoeBDP**, **hoeTMR** の細胞毒性を評価した。細胞毒性は、ミトコンドリアの代謝活性をもとに定量化した。比較のため Hoechst 33342 を同一条件で評価した。本研究において開発した Hoechst 連結蛍光プローブは、観察に用いる濃度条件 (1-5 μ M) では殆ど毒性を示さないことが明らかとなった。一方で、Hoechst 33342 では顕著な細胞毒性が確認された。

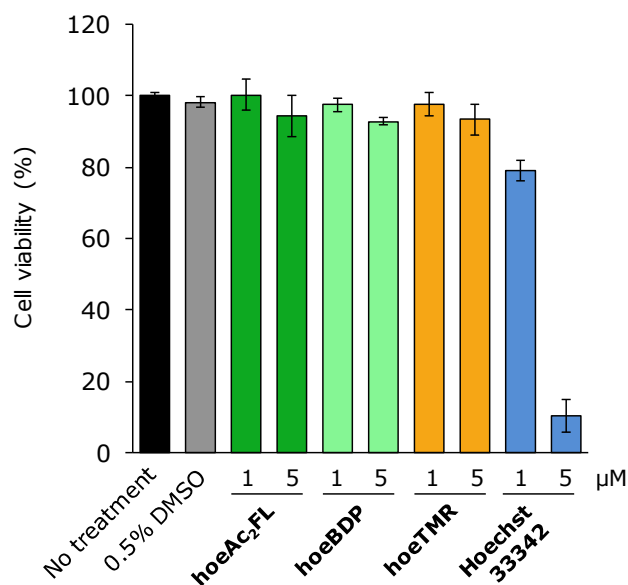


図 28 HeLa 細胞を用いた細胞毒性試験の結果 (n = 3, mean \pm s.d.)

2.5 考察

2.5.1 Hoechst 連結蛍光プローブと DNA の親和性について

in vitro で Hoechst 連結蛍光プローブと DNA の親和性は、 $K_D = 0.028 - 2.5 \mu\text{M}$ と Hoechst 単独時 ($K_D \sim 2 \text{ nM}$) に比べ 1/10 ~ 1/1000 となっていることが明らかとなった (図 12, 図 22, 図 23)。しかし、いずれの Hoechst 連結蛍光プローブも細胞内では明確な核局在化を示している (図 12, 図 24)。さらに、最近になって Kai らは、この Hoechst 連結法を超解像イメージング用の蛍光プローブ(SiR)に適用することで核内 DNA の超解像イメージングが行えることを報告している (図 29) [2-15]。この Hoechst 連結 SiR (SiR-Hoechst) の hpDNA に対する親和性は、 $K_D = 8.4 \mu\text{M}$ と報告されている。以上の結果は、蛍光プローブの核局在化に必要な DNA との親和性が、一桁 μM オーダーの K_D で十分であることを示すものと考えられる。

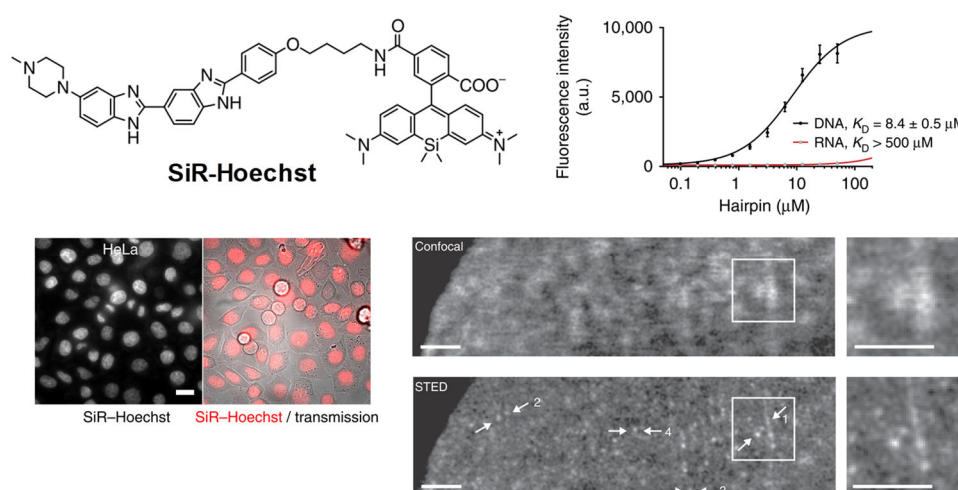


図 29 SiR-Hoechst を用いた核内 DNA (クロマチン) の超解像イメージング [2-15]

2.5.2 Hoechst 連結法と pyrrole-imidazole polyamide 連結法の比較

Hoechst 連結法と同様に、DNA と結合する小分子化合物を蛍光プローブに連結することで核局在化を達成する汎用的アプローチとして、pyrrole-imidazole polyamide (PIPA)を用いた手法が知られている。Peter らは、*N*-methylimidazole と *N*-methylpyrrole を一定の組み合わせで連結することで、細胞膜透過性と核局在性を併せ持つ PIPA の開発に成功している。さらに、この PIPA を連結することで、任意の蛍光プローブに核局在性を付与することにも成功している (図 30) [2-16]。しかし、細胞核内の DNA との結合に十分な親和性を持つ PIPA の分子量は 1000 以上と大きく、さらに PIPA 連結蛍光プローブの核局在化には 10 h 以上のインキュベーションを必要とする。PIPA に対して Hoechst の分子量は 453 と小さく、Hoechst 連結蛍光プローブの核局在化は、15 - 60 min で完了する。また、PIPA には連結する蛍光プローブの骨格依存的に細胞膜透過性が顕著に低下するという問題がある。例えば、PIPA-FITC (FITC = fluorescein 5-isothiocyanate) は細

胞膜透過性を示すが、PIPA-BODIPY は細胞膜を透過できない。一方で Hoechst 連結法は、fluorescein, BODIPY いずれの蛍光プローブも核局在化を達成することが可能である (図 30)。以上の結果は、Hoechst 連結法が、任意の蛍光プローブに核局在性を付与するための汎用的な分子設計法であることを示すものであると考えられる。

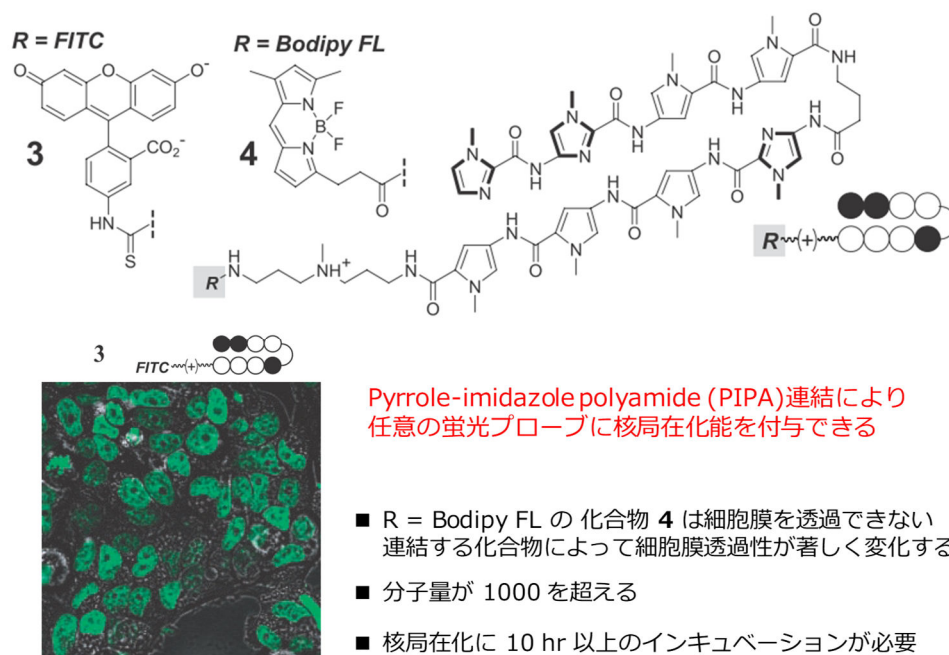


図 30 PIPA 連結法による蛍光プローブの核局在化^[2-16]

2.6 結論

本章では、既存の蛍光色素に DNA 結合性の化合物である Hoechst を連結することで蛍光色素に核局在性を付与する Hoechst 連結法を開発した。光化学特性や分子構造の異なる蛍光色素 (fluorescein / BODIPY / tetramethylrhodamine) に Hoechst 連結法を適用することで、4 種類の核局在性蛍光プローブ (**hoeFL** / **hoeAc2FL** / **hoeBDP** / **hoeTMR**) を新規設計・合成した。これら Hoechst 連結蛍光プローブは、いずれも細胞膜透過性と高い核局在性を示した。これら Hoechst 連結蛍光プローブの核局在化のメカニズムは、*in vitro* で詳細に検討を行い、蛍光プローブに連結した Hoechst が DNA に結合することで核局在化していることを明らかにした。また、解離定数 K_D から導出した Hoechst 連結蛍光プローブの DNA に対する親和性は、Hoechst 単独時の 10~1000 倍程度低いことが明らかとなった。しかし、今回開発した Hoechst 連結蛍光プローブは、いずれも核内 DNA と高効率に結合し核局在化した。本結果は、核内 DNA との結合を介した核局在性蛍光プローブ開発において、核局在化に必要となる DNA に対する親和性が一桁 μM で十分であることを示す重要な知見になるものと考えられる。さらに、本研究で開発した **hoeAc2FL** は、由来や特性が異なる多様な細胞株や非固定組織において明確な核局在性を示し、核染色剤として広く利用できることが示された。

以上より本研究では、Hoechst 連結法が、核局在性蛍光プローブを開発するための汎用的かつ合理的な分子設計基盤となることを実証した。本手法により開発した Hoechst 連結蛍光プローブは、さまざまな蛍光波長で、核の形態や核内で進行する分子プロセスを選択的に可視化するための基盤ツールとして応用できるものと期待できる^[2-17]。

2.7 実験方法

2.7.1 化合物合成に使用した試薬、測定装置

実験に用いた試薬は精製すること無く購入品のまま使用した。薄層クロマトグラフィー (TLC)は、TLC アルミシート シリカゲル 60 F₂₅₄ (Merck)を用いて行った。フラッシュカラムクロマトグラフィーは、シリカゲル 60 N (球状、中性、40-50 μm)を用いて行った。

逆相 HPLC 精製は、YMC-Pack ODS-A column (20 x 250 mm)を Hitachi LaChrom Elite system に接続し、化合物の溶出を 220 nm の UV 吸収で確認しつつ行った。¹H-NMR スペクトルは JEOL AL-400 (400 MHz)を用いて測定し、ケミカルシフト(d ppm)は tetramethylsilane のピーク(0 ppm)を基準に決定した。¹H-NMR スペクトルからは、次の情報を取得した。ケミカルシフト, 積分値, s = singlet, d = doublet, t = triplet, m = multiplet, 結合定数 (*J*)

High-resolution mass (HRMS)解析は、桑田啓子博士 (ITbM, 名古屋大学) に行って頂いた。

試薬の省略表記

DIPEA: *N, N*-diisopropylethylamine

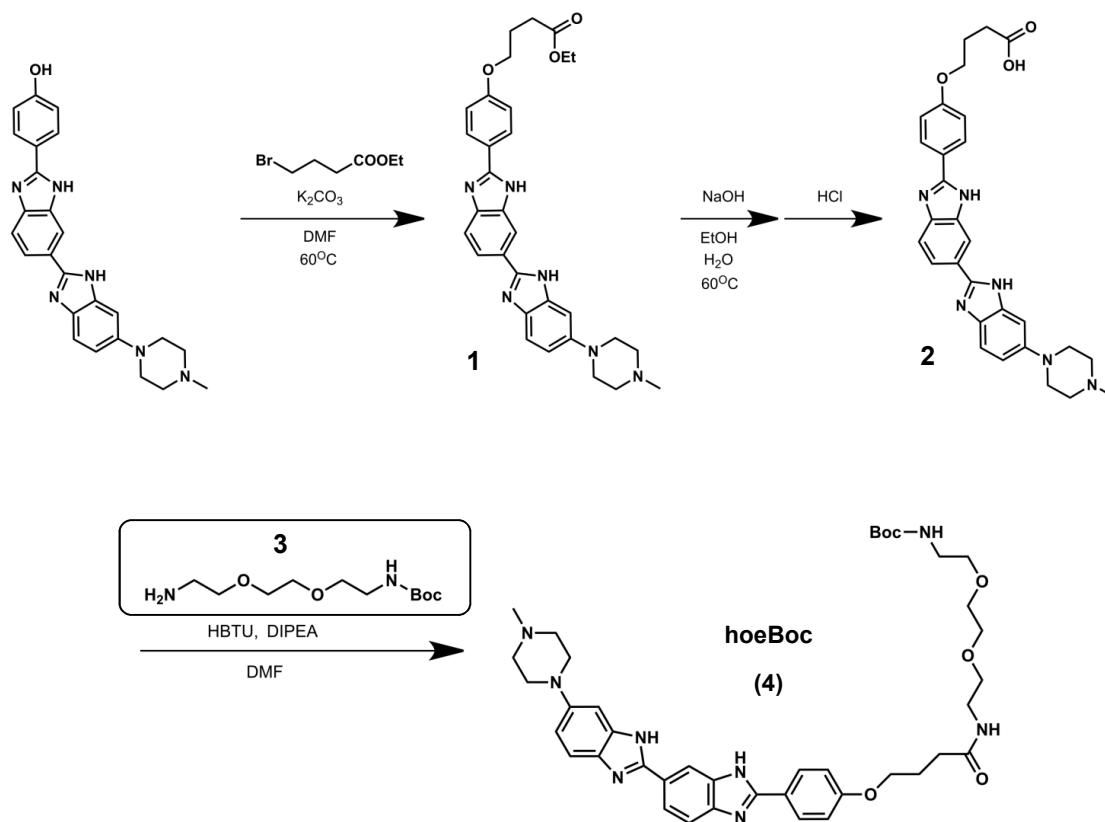
DMF: *N, N*-dimethylformamide

DMSO: dimethyl sulfoxide

EDC: 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride

HBTU: *O*-(benzotriazole-1-yl)-*N, N, N, N*'-tetramethyluronium hexafluorophosphate

TFA: trifluoroacetic acid

2.7.2 hoeBoc (化合物 4)の合成^{[2-9][2-18]}図 31 hoeBoc (化合物 4)の合成スキーム^{[2-9][2-18]}

化合物 1 の合成

Hoechst 333258(3HCl) (1.00 g, 1.87 mmol)と ethyl-4-bromobutyrate (0.55g, 2.82 mmol)を乾燥 DMF (25 mL)に溶解させた後に K_2CO_3 (1.56 g, 11.3 mmol)を添加し、 60°C で 20 h 撹拌した。反応は Ar 雰囲気下で行った。反応の進行は TLC (silica, CHCl_3 : MeOH = 2:1)で確認した。その後、反応溶液を室温まで冷却し、吸引ろ過により沈殿物を除去し、ろ液をエバポレーションにより濃縮した。得られた粗生成物を CHCl_3 に再溶解させた後、湿式カラムクロマトグラフィー (silica, CHCl_3 : MeOH = 10:1 \rightarrow CHCl_3 : MeOH = 10:3)により精製した。回収したフラクションを濃縮した後、 Et_2O 中で粉体化し吸引ろ過で回収し、化合物 **1** を薄黄色固体 (0.50 g, 50%)として得た。

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 8.22 (1H, s), 8.01 (2H, d, $J = 9.0$ Hz), 7.93 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 7.66 (1H, s), 7.49 (1H, s), 7.12 (1H, s), 7.04 (3H, m), 4.14 (2H, q, $J = 7.1$ Hz), 4.06 (2H, m), 3.21 (4H, m), 2.66 (4H, m), 2.51 (2H, t, $J = 6.4$ Hz), 2.37 (3H, s), 2.09 (2H, m), 1.25 (3H, t, $J = 4.0$ Hz)

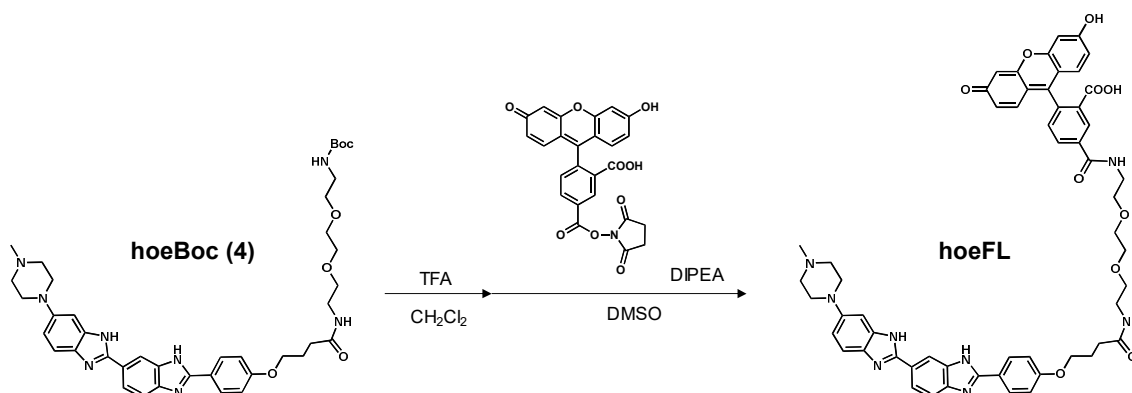
hoeBoc（化合物 4）の合成

Ethanol (3.0 mL) と 1 N NaOH aq. (3.0 mL, 3.0 mmol) の混合液に、化合物 **1** (400 mg, 0.743 mmol) を添加した懸濁液を 60℃ で 2.5 h 撹拌した。反応の進行は、TLC (silica, CHCl₃: MeOH = 2:1) で確認した。反応溶液を室温まで冷却後、10% HCl aq. を滴下し反応溶液を pH 5 に調整した。沈殿した固体を吸引ろ過により回収し、残渣を予冷した H₂O (3.0 mL, 4℃) と acetone (20 mL, 室温) で洗浄した。残渣を回収し、化合物 **2** を黄色固体 (380 mg) として化合物 **2** を得た。得られた化合物 **2** の全量 (380 mg) を乾燥 DMF (8.0 mL) に懸濁し、DIPEA (0.63 mL, 3.72 mmol) を添加した。反応は Ar 雰囲気下で行った。5 分撹拌の後、懸濁液が透明になったことを確認し、HBTU (310 mg, 0.817 mmol) を添加した。更に 5 分撹拌の後、乾燥 DMF (3.0 mL) に溶解させた化合物 **3** (206 mg, 0.817 mmol) を添加し、室温で 2.5 h 撹拌した*。反応の進行は、TLC (silica, AcOEt: MeOH: NH₃ aq. = 100:100:1) で確認した。反応溶液を濃縮した後、湿式カラムクロマトグラフィー (silica, AcOEt: MeOH = 1:1) で精製した。回収したフラクションを濃縮した後、Et₂O 中で粉体化し吸引濾過で回収し、**hoeBoc** (化合物 **4**) を薄黄色固体 (336 mg, 61%; 2 steps) として得た。

*化合物 **3** は参考文献^[2-9]の方法に従い合成した。

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8.23 (1H, s), 8.06 (2H, d, *J* = 9.2 Hz), 7.96 (1H, brd), 7.70 (1H, brd), 7.51 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.15 (1H, s), 7.10 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.06 (1H, dd, *J* = 2.4, 8.8 Hz), 4.10 (2H, t, *J* = 6.2 Hz), 3.58 (4H, s), 3.54 (2H, t, *J* = 5.4 Hz), 3.49 (2H, m, overlapped with the residual ether peak), 3.39 (2H, t, *J* = 5.6 Hz), 3.24 (4H, m), 3.20 (2H, t, *J* = 5.6 Hz), 2.69 (4H, m), 2.44 (2H, t, *J* = 7.2 Hz), 2.39 (3H, s), 2.12 (2H, m), 1.42 (9H, s)

2.7.3 Hoechst 連結蛍光プローブの合成

図 32 Hoechst 連結 fluorescein (**hoeFL**)の合成スキーム**hoeBoc** (化合物 **4**)の脱 Boc 反応

CH₂Cl₂ (2.0 mL)に **hoeBoc** (化合物 **4**) (74 mg, 0.10mmol)を溶解させた後、TFA (1 mL)を加え室温で 1 h 攪拌した。その後、toluene (5 mL)添加と共沸処理を 2 度繰り返し行った。得られた化合物を DMSO (2.5 mL)に溶解させ、脱保護した化合物の 40 mM DMSO 溶液を調製した。精製操作は行わずに次のステップに進んだ。

hoeFL の合成

上記の脱保護した化合物 **4** の DMSO 溶液 (190 μ L, 7.6 μ mol)に 5-Carboxyfluorescein succinimidyl ester (3.0 mg, 6.3 μ mol)と DIPEA (10.3 μ L, 60.6 μ mol)を添加し、室温で 2 h 静置した。その後、逆相 HPLC (C18 カラム, MeCN(0.1%TFA): H₂O(0.1%TFA))により化合物を精製し、Et₂O で粉体化し吸引ろ過で回収し、橙色固体 (7.5 mg, 89% 3TFA 塩)として **hoeFL** を得た。

¹H NMR (400 MHz, d₅-pyridine): δ 9.72 (1H, m), 9.06 (1H, s), 8.97 (1H, s), 8.75 (1H, m, overlapped with the solvent peak), 8.62 (2H, m), 8.48 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.97 (1H, d, J = 8.8 Hz), 7.82 (1H, d, J = 8.4 Hz), 7.43, (1H, s), 7.41 (1H, d, J = 7.6 Hz), 7.15 (1H, d, J = 7.6 Hz), 7.10 (4H, m), 6.93 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.86 (2H, d, J = 8.0 Hz), 4.08 (2H, t, J = 6.4 Hz), 3.93 (2H, m), 3.83 (2H, m), 3.67-3.58 (8H, m), 3.41 (4H, m), 2.95 (4H, m), 2.60 (2H, t, J = 6.8 Hz), 2.55 (3H, s), 2.28 (2H, m).

HRMS: calcd for [M+H]⁺, 999.4036; found, 999.4006.

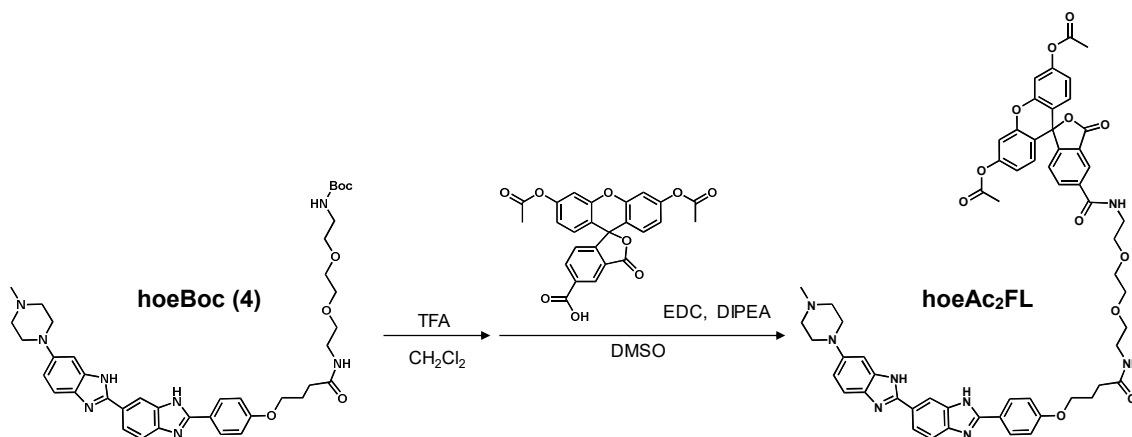
hoeAc₂FL の合成

図 33 Hoechst 連結 fluorescein diacetate (**hoeAc₂FL**)の合成スキーム

上記の脱保護した化合物 **4** の DMSO 溶液 (328 μ L, 13.1 μ mol) に 5-Carboxyfluorescein diacetate (5.0 mg, 10.9 μ mol)、DIPEA (17.8 μ L, 104.7 μ mol)、EDC (2.5 mg, 13.0 μ mol)を添加し、室温で 2 h 静置した。その後、逆相 HPLC (C18 カラム, MeCN(0.1%TFA): H₂O(0.1%TFA))により化合物を精製し、Et₂O で粉体化し吸引ろ過で回収し、薄黄色固体 (6.5 mg, 42% 3TFA 塩)として **hoeAc₂FL** を得た。

¹H NMR (400 MHz, d5-pyridine): δ 9.70 (1H, m), 8.98 (2H, s), 8.77 (1H, m), 8.63 (1H, d, J = 8.4 Hz), 8.54 (1H, d, J = 8.0 Hz), 8.49 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.98 (1H, d, J = 8.0 Hz), 7.82 (1H, d, J = 8.8 Hz), 7.44 (1H, s), 7.32 (2H, d, J = 2.4 Hz), 7.27 (1H, d, J = 7.6 Hz), 7.14 (1H, d, J = 7.6 Hz), 7.10 (4H, m), 7.03 (2H, d, J = 8.8 Hz), 4.08 (2H, t, J = 6.0 Hz), 3.83 (2H, m), 3.83 (2H, m), 3.68-3.59 (8H, m), 3.43 (4H, m), 3.00 (4H, m), 2.60 (2H, t, J = 7.6 Hz), 2.59 (3H, s), 2.28 (2H, m), 2.22 (6H, s)

HRMS: calcd for [M+H]⁺, 1083.4247; found, 1083.4240

hoeBDP の合成

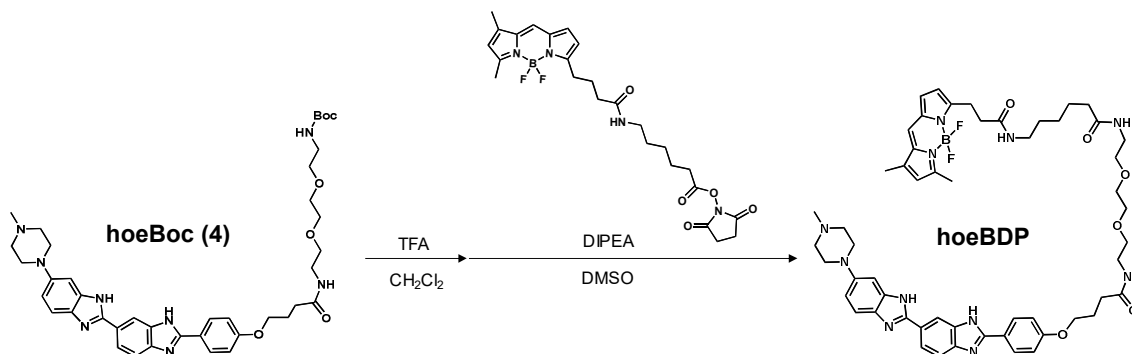


図 34 Hoechst 連結 BODIPY (hoeBDP)の合成スキーム

上記の脱保護した化合物 **4** の DMSO 溶液 (299 μ L, 12.0 μ mol)に BODIPY FL-X succinimidyl ester (5.0 mg, 10.0 μ mol)と DIPEA (16.3 μ L, 95.9 μ mol)を添加し、室温で 2 h 静置した。その後、逆相 HPLC (C18 カラム, MeCN(0.1%TFA): H₂O(0.1%TFA))により化合物を精製し、Et₂O で粉体化し吸引ろ過で回収し、茶橙色固体 (8.2 mg, 60% 3TFA 塩)として **hoeBDP** を得た。

¹H NMR (400 MHz, d₅-pyridine): δ 8.98 (1H, m), 8.62 (1H, d, J = 8.8), 8.49 (2H, d, J = 8.4 Hz), 8.49 (2H, m), 7.98 (1H, d, J = 8.0 Hz), 7.81 (1H, d, J = 8.8 Hz), 7.43 (1H, s), 7.36 (1H, s), 7.12 (3H, m), 7.01 (1H, d, J = 3.6 Hz), 6.51 (1H, d, J = 3.6 Hz), 6.02 (1H, s), 4.10 (2H, t, J = 6.0 Hz), 3.77 (2H, t, J = 7.6 Hz), 3.63 (8H, m), 3.55 (4H, s), 3.41 (6H, m), 2.94 (6H, m), 2.61 (2H, t, J = 7.2 Hz), 2.59 (3H, s), 2.55 (3H, s), 2.36-2.27 (4H, m), 2.09 (3H, s), 1.77 (2H, m), 1.57 (2H, m), 1.39 (2H, m).

HRMS: calcd for [M+H]⁺, 1028.5488; found, 1028.5479

hoeTMR の合成

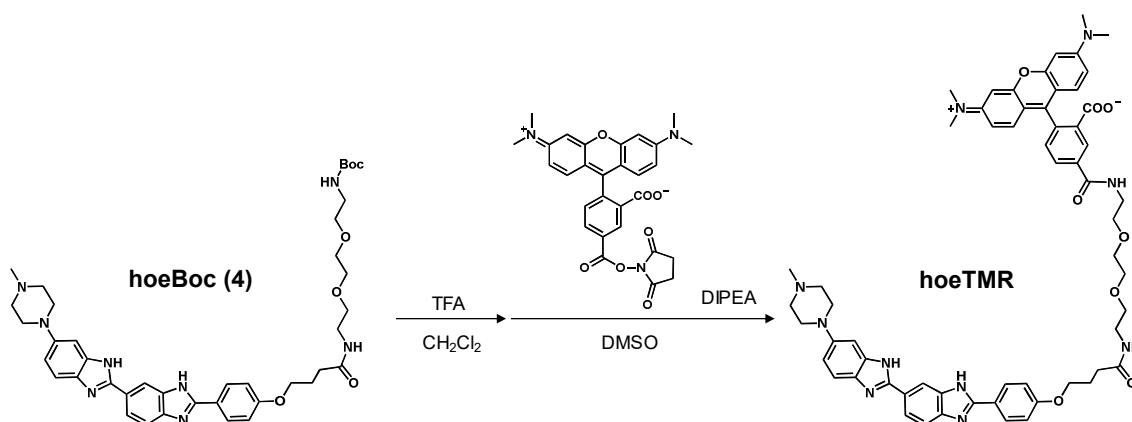


図 35 Hoechst 連結 tetramethyl rhodamine (**hoeTMR**)の合成スキーム

上記の脱保護した化合物 **4** の DMSO 溶液 (284 μL , 11.4 μmol)に 5-Carboxytetramethylrhodamine succinimidyl ester (5.0 mg, 9.5 μmol)と DIPEA (15.5 μL , 91.1 μmol)を添加し、室温で 2 h 静置した。その後、逆相 HPLC (C18 カラム, $\text{MeCN}(0.1\%\text{TFA})$: $\text{H}_2\text{O}(0.1\%\text{TFA})$)により化合物を精製し、 Et_2O で粉体化し吸引ろ過で回収し、黒茶褐色固体 (8.3 mg, 60% 3TFA 塩)として **hoeTMR**を得た。

^1H NMR (400 MHz, d_5 -pyridine): δ 9.79 (1H, m), 9.17 (1H, s), 8.98 (1H, s), 8.79 (1H, m), 8.66 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 8.62 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 8.49 (2H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.98 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.82 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 7.47 (1H, s), 7.46 (1H, d, $J = 7.2$ Hz), 7.13 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.08 (2H, d, $J = 8.8$ Hz), 6.94 (2H, d, $J = 8.8$ Hz), 6.65 (2H, s), 6.59 (2H, d, $J = 9.2$ Hz), 4.07 (2H, t, $J = 6.4$ Hz), 3.98 (2H, m), 3.87 (2H, m), 3.69-3.60 (8H, m), 3.46 (4H, m), 3.07 (4H, m), 2.87 (12H, s), 2.64 (3H, s), 2.61 (2H, t, $J = 6.8$ Hz), 2.28 (2H, m).

HRMS: calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1053.4982; found, 1053.4965

2.7.4 コントロール実験用化合物の合成

FL-Boc (化合物 5) の合成

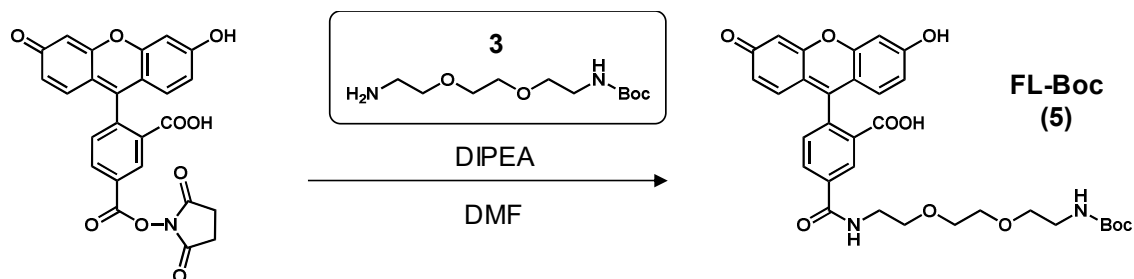


図 36 FL-Boc (化合物 5)の合成スキーム

化合物 **3** は参考文献^[2-9]の方法に従い合成した。5-Carboxyfluorescein succinimidyl ester (10 mg, 21.1 μmol)、化合物 **3** (7.4 mg, 29.8 μmol)、DIPEA (8.8 μL , 21.1 μmol)を乾燥 DMF (250 μL)に溶解させ、室温で 2 h 静置した。その後、逆相 HPLC (C18 カラム, MeCN(0.1%TFA): H₂O(0.1%TFA))により化合物を精製し、Et₂O で粉体化し吸引ろ過で回収し、黄色固体 (8.7 mg, 68%)として **FL-Boc** (化合物 **5**)を得た。

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8.54 (1H, s), 8.24 (1H, d, $J = 7.2$ Hz), 7.38 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 6.86 (2H, s), 6.83 (2H, d, $J = 8.8$ Hz), 6.71 (2H, d, $J = 7.2$ Hz), 3.72-3.66 (8H, m), 3.53 (2H, t, $J = 5.4$ Hz), 3.21 (2H, t, $J = 5.4$ Hz), 1.40 (9H, s).

HRMS: calcd for [M+H]⁺, 607.2287; found, 607.2284.

2.7.5 Hoechst 連結蛍光プローブの光化学特性の評価 (*in vitro*)

Hoechst 連結蛍光プローブの DNA 結合能・光化学特性の解析条件

スペクトル測定は、1 cm 石英キュベットセルを用いて行った。吸収スペクトルと蛍光スペクトルは、分光光度計と分光蛍光光度計を用いて取得した(Hitachi U-3900H, Hitachi F-7000)。緩衝液の調製は、超純水 (Sartorius Arium Pro DI ultrapure water system) を用いて行った。Hoechst 連結蛍光プローブ (**hoeFL**, **hoeAc2FL**, **hoeBDP**, **hoeTMR**) は、1 mM DMSO ストックを調製し、Tris buffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7.4) に溶解させて蛍光スペクトルを取得した。28 mer hpDNA は、オペロンバイオテクノロジーより購入した。hpDNA は超純水に溶解して 1 mM ストック溶液を調製し、滴定実験に使用した。解離定数 K_D は、Hoechst 連結蛍光プローブと hpDNA が 1:1 で結合しているものとして導出した。Hoechst 連結蛍光色素溶液の写真は、トランスイルミネーターを用いた UV 光照射 (365 nm) により取得した。

Hoechst 連結蛍光プローブの蛍光量子収率の導出

本研究で開発した Hoechst 連結蛍光プローブ (**hoeFL**, **hoeBDP**, **hoeTMR**) の hpDNA 添加前後の蛍光量子収率は、次の条件で取得した蛍光スペクトルと吸収スペクトルより導出した。

hoeFL (2 μ M): ± 20 μ M hpDNA, Buffer: 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7.4, 20°C, $\lambda_{ex} = 460$ nm

hoeBDP (2 μ M): ± 8 μ M hpDNA, Buffer: **hoeFL** と同じ, $\lambda_{ex} = 460$ nm

hoeTMR (2 μ M): ± 27 μ M hpDNA, Buffer: **hoeFL** と同じ, $\lambda_{ex} = 500$ nm

蛍光量子収率 Φ_{sample} は、励起波長の吸光度 (Abs) と蛍光スペクトルの面積 ($\Sigma [F]$) を取得し、次式に代入することで導出した。**hoeFL**, **hoeBDP** については、標準試料として 0.1 M NaOH に溶解させた fluorescein ($\Phi_{standard} = 0.85$) [2-19a] を用いた。同様に、**hoeTMR** については、標準試料として 25°C の EtOH に溶解させた rhodamine B ($\Phi_{standard} = 0.65$) を用いた [2-19b]。

$$\Phi_{sample} = \Phi_{sample}^{Abs_{standard}} \frac{\sum [F_{sample}]}{Abs_{sample} \sum [F_{standard}]}$$

2.7.6 細胞実験

培養条件

HeLa, NIH3T3, C2C12, HEK293 細胞は、100 U/mL ペニシリン、100 μ g/mL ストレプトマイシン、10%非働化ウシ胎児血清を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を用いて、5%CO₂、37°C で培養した。PC12 細胞の培養には、100 U/mL ペニシリン、100 μ g/mL ストレプトマイシン、5%非働化ウマ血清、5%非働化ウシ胎児血清を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を用いた。Jurkat 細胞の培養には、100 U/mL ペニシリン、100 μ g/mL ストレプトマイシン、10%非働化ウシ胎児血清を含む RPMI-1640 を用いた。

蛍光プローブの細胞内導入やイメージングを行う際は、100 U/mL ペニシリン、100 μ g/mL ストレプトマイシンを含み、フェノールレッドと血清を含まない DMEM (DMEM_i) と RPMI-1640 (RPMI_i) を使用した。

共焦点レーザー顕微鏡観察

全てのイメージングは、Olympus IX81-ZDC/FV1000 共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った。蛍光像と微分干渉観察像は、UPlanSApo 10x/0.40 NA, UPlanSApo 40x/0.90 NA, PlanApo N60x/1.42 NA 油浸対物レンズを用いて取得した。蛍光プローブの励起に使用したレーザー波長は次の通りである。405 nm レーザー: Hoechst 33342, 488 nm レーザー: **hoeAc2FL** / **hoeFL** / **hoeBDP**, 543 nm レーザー: **hoeTMR**。取得した蛍光像の解析は、Olympus FLUOVIEW viewer software を用いて行った。

Hoechst 連結蛍光プローブの導入条件と観察条件

35 mm ガラス底ディッシュ (AGT Techno Glass) に細胞を播種し、5% CO₂、37°Cの条件下で 24 h 培養した。その後、DMEM_i (Jurkat については RPMI_i) で 2 度洗浄を行い、図のキャプションに記した終濃度で Hoechst 連結蛍光プローブを添加し、5% CO₂、37°Cでインキュベーションを行った。その後 DMEM_i (Jurkat については RPMI_i) で細胞を 2 回洗浄し、共焦点レーザー顕微鏡観察を行った。洗浄操作なし (no wash) の場合は、インキュベーション後の細胞を直接共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

ラット海馬スライスの調製と **hoeAc2FL** を用いた核染色

当該動物実験は、長岡技術科学大学 生物系の霜田靖研究室にて実施した。本実験は、長岡技術科学大学が規定する動物実験ガイドラインに則り実施した。ラットの海馬スライスは、過去の文献に記された手順に沿って行った^[2-20]。生後 19 日の Wister ラット (Japan SLC) を Et₂O で麻酔を掛け、首を切断した。その後、素早く開頭し脳を摘出し、氷冷した人工脳脊髄液 (Artificial Cerebrospinal fluid) に浸した。海馬全体を切り、海馬スライスを調製の後 ACSF 中で維持した。その後、ACSF 中に終濃度 20 μM **hoeAc2FL** を添加し 5% CO₂、37°Cで 90 min インキュベーションを行った後、共焦点レーザー顕微鏡観察を行った。

ACSF の組成: 124 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 3 mM KCl, 1.24 mM KH₂PO₄, 1.4 mM MgSO₄, 2.2 mM CaCl₂, 10 mM glucose

毒性試験

96-well プレート (TPP) に HeLa 細胞を播種し、5% CO₂、37°Cで 24 h インキュベーションした。その後、2 回洗浄操作を行い、細胞培養液である DMEM_i に評価する化合物 (0.5% DMSO, 1 or 5 μM **hoeAc2FL**, 1 or 5 μM **hoeBDP**, 1 or 5 μM **hoeTMR**, 1 or 5 μM Hoechst 33342) を添加し、5% CO₂、37°Cで 2 h インキュベーションした。その後、10%非働化ウシ胎児血清を含む DMEM で細胞を洗浄し、その血清含有 DMEM 中で 24 h インキュベーションを行い、生細胞数を Cell Counting Kit-8 (Dojindo)を用いて定量化した。

2.8 参考文献

- [2-1] Lavis L.D. and Raines R. T., *ACS Chem. Biol.* **3**, 142 (2008)
- [2-2] Johnson I. and Spence M.T.Z., *The Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, 11th edn, ch. 8.1 and 12.5 (2010)
- [2-3] Haraguchi T. *et al.*, *Genes Cells* **2**, 369 (1997)
- [2-4] (a) Peng X. *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 4180 (2011), (b) Dumat B. *et al.*, *Org. Biomol. Chem.* **10**, 6054 (2012), (c) Erve A. *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **34**, e43 (2006), (d) Law G.-L. *et al.*, *Chem. Commun.* **46**, 2391 (2010)
- [2-5] (a) Rosania G.R. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 1130 (2003), (b) Feng S. *et al.*, *Chem. Commun.* **46**, 436 (2010), (c) Lee J. W. *et al.*, *Chem. Commun.* 1852 (2003), (d) Ghosh K.K. *et al.*, *Chem. Commun.* **51**, 9336 (2015)
- [2-6] (a) Keppler A. *et al.*, *Nat. Biotechnol.* **21**, 86 (2003), (b) Keppler A. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.* **101**, 9955 (2004), (c) Flukinavicius G. *et al.*, *Methods. Mol. Biol.* **1266**, 107 (2015)
- [2-7] Gautier A. *et al.*, *Chem. Biol.* **15**, 128 (2008)
- [2-8] (a) Los G.V. *et al.*, *ACS Chem. Biol.* **3**, 373 (2008), (b) Watkins R.W. *et al.*, *Org. Biomol. Chem.* **7**, 3969 (2009), (c) Hauke S. *et al.*, *Chem. Sci.* **8**, 559 (2017)
- [2-9] Ishida M. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 12684 (2013)
- [2-10] Dasari M. *et al.*, *Org. Lett.* **12**, 3300 (2010): Murthy らは、Hoechst 連結した近赤外蛍光プローブを報告している。しかし、そのプローブは細胞膜透過性が無く細胞内では使用できない。この報告では、ネクローシスにより細胞外に排出される DNA を検出することを目的としている。
- [2-11] Breusegem S.Y. *et al.*, *J. Mol. Biol.* **315**, 1049 (2002)
- [2-12] (a) Takafusa H. *et al.*, *Anal. Chem.* **73**, 939 (2001), (b) Takafusa H. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 1653 (2002), (c) Rucker V.C. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 1195 (2003)
- [2-13] Rotman B. and Papermaster B.W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **55**, 134 (1966)
- [2-14] Cohen L.B. *et al.*, *J. Membr. Biol.* **19**, 1 (1974)
- [2-15] Lukinavicius G. *et al.*, *Nat. Commun.* **6**, 8497 (2015)
- [2-16] (a) Best T.P. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 12063 (2003), (b) Edelson B.S. *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **32**, 2802 (2004)
- [2-17] Ueda M. *et al.*, *ACS Cent. Sci.* **3**, 462 (2017): 本研究において開発した **hoeAc2FL** を用いることで、従来の Hoechst や DAPI では染色・観察が困難であったシロイヌナズナの孔辺細胞の核染色が行えることが報告されている。
- [2-18] Rastogi K. *et al.*, *J. Med. Chem.* **45**, 4485 (2002)
- [2-19] (a) Parker C.A. and Rees W.T., *Analyst* **85**, 587 (1960), (b) Kubin R.F. and Fletcher A.N., *J. Luminesc.* **27**, 455 (1982)
- [2-20] Ueno S. *et al.*, *J. Cell Biol.* **158**, 215 (2002)

第三章 Hoechst 連結 fluorescein を用いた核内選択的 pH 測定技術の開発

3.1 序

細胞内 pH は、オルガネラ・区画領域毎に精密に制御されており、領域特異的な分子プロセスの適切な進行において重要な因子として認識されている^[3-1]。核内も例外ではなく、核内で進行する遺伝子転写、ヒストン修飾、エピジェネティクス制御といった分子プロセス制御において、pH が重要であると考えられている^[3-2]。核内 pH は、核内と細胞質が核膜孔でつながれているため、細胞質 pH と同じと考えられている^[3-1]。その一方で、核内 pH は細胞質 pH と値が異なることが報告されている^{[3-3][3-4]}。しかし、細胞全体を拡散する pH 応答性の蛍光プローブである SNARF を用いた実験系では、核内蛍光と細胞質蛍光を画像解析時に ROI (region-of-interest) を指定することで核内 pH と細胞質 pH を導出するが、その境界線を正確に設けることは難しい場合が多い。したがって、核内 pH を正確に測定するためには pH 応答性蛍光プローブを核内選択的に配置し測定する技術が重要であると考えられる。こうした背景から、Benink らは、SNARF をタンパク質ラベル化システム (Halo タグ) を用いて核局在化させることで、核内選択的な pH 測定が行えることを報告している^[3-5]。しかし、この手法では外来遺伝子の導入によるラベル化用タンパク質の発現を必要とするため、遺伝子導入効率の低い細胞株や組織・個体への適用が難しいという問題がある。そこで、第三章では、第二章において確立した Hoechst 連結法による蛍光プローブの核局在化戦略を応用することで、核内選択的な pH 測定技術の開発を目指した。

3.1.1 hoeFL を用いた核内選択的 pH 選択的センシングの基本戦略

第二章において、緑色蛍光色素である fluorescein に Hoechst を連結することで、核局在性 fluorescein (hoeFL)を開発した。この hoeFL を構成する Hoechst^[3-6]と fluorescein (FL)^[3-7]は、いずれも pH 依存的に蛍光強度が変化する蛍光プローブとして知られている。そこで本研究では、細胞核に局在化した hoeFL の Hoechst 蛍光と FL 蛍光の強度比をモニターすることで、pH 依存的な蛍光強度比変化に基づく核内選択的 pH 測定が可能になるものと考えた (図 37)。

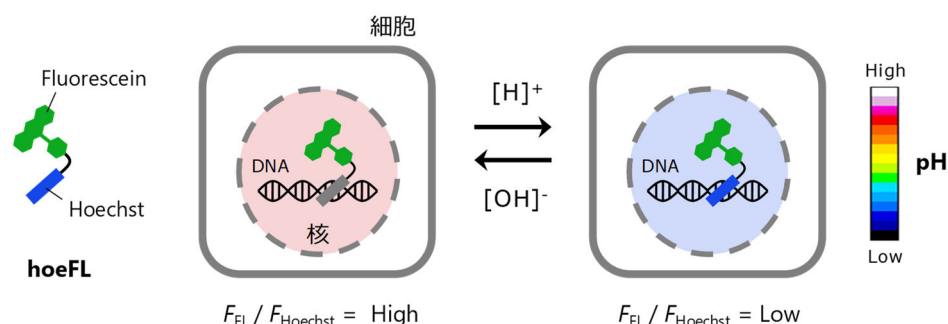


図 37 hoeFL を用いた Hoechst 蛍光 ($F_{Hoechst}$) と fluorescein 蛍光 (F_{FL}) の強度比の変化 ($F_{FL}/F_{Hoechst}$) に基づく核内選択的 pH 測定技術の概略図

3.2 結果

3.2.1 hoeFL の DNA 結合能の pH 依存性の評価

hoeFL を用いた核内選択的 pH センシングを実現するにあたり、まず、hoeFL と DNA の親和性（解離定数： K_D ）の pH 依存性を評価した。各 pH 条件における K_D は、第二章と同様に hpDNA 添加時の hoeFL の蛍光強度増幅（ $\lambda_{ex}=460$ nm）に対するフィッティングにより導出した（図 38）。その結果、生理的な pH（pH 5.5-8.3）において、hoeFL の hpDNA に対する解離定数は、 $K_D=2.5$ - 6.3 μ M と導出できた。本結果より hoeFL の DNA 結合能が、生理的な pH 条件下で殆ど変化しないことが明らかとなった。

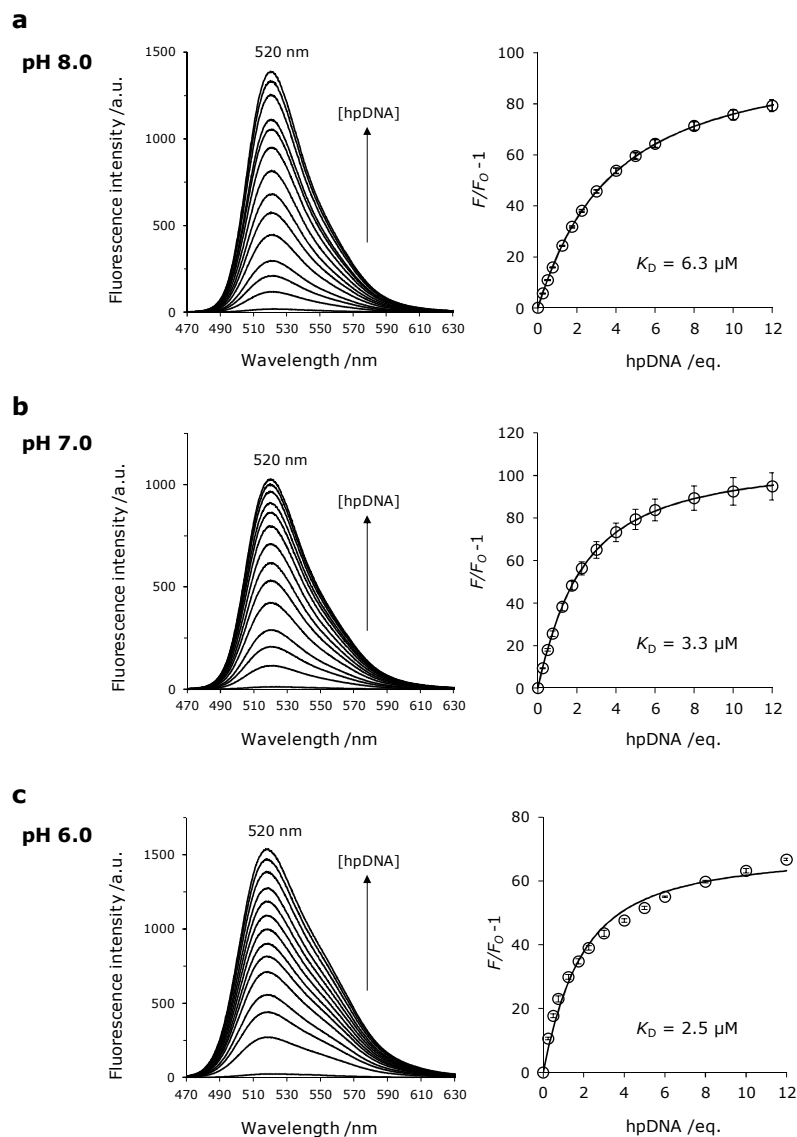


図 38 hoeFL の DNA 結合能の pH 依存性の評価; hpDNA 添加時の蛍光スペクトル変化 (left), 520 nm の蛍光強度増大に対するカーブフィッティング ($n = 3$, mean \pm s.d.), (a) pH 8.0, (b) pH 7.0, (c) pH 6.0, 測定条件: 2 μ M hoeFL, 0-24 μ M hpDNA, 50 mM MOPS, 100 mM NaCl, 20°C, $\lambda_{ex} = 460$ nm

3.2.2 hoeFL-DNA 複合体の pH 応答能の評価と励起波長の検討 (*in vitro*)

hoeFL-hpDNA 複合体 (hoeFL_{DNA}) の pH 変化に対する蛍光応答特性を *in vitro* で評価した。hoeFL_{DNA} を緩衝液に溶解させ、各 pH 条件における蛍光スペクトルを取得した。蛍光スペクトル取得には、蛍光顕微鏡観察に汎用的に用いられる 405 nm の励起光を使用した。405 nm 励起時の各 pH (pH 5.5-8.3) における蛍光スペクトルを図 39 に示した。pH の低下に伴い、hoeFL_{DNA} の 460 nm の蛍光強度 (F_{460}) は増大し、520 nm の蛍光強度 (F_{520}) はほぼ一定であった。pH 変化に伴う蛍光強度比 (F_{520}/F_{460}) の変化を図 39b に示した。本結果より、hoeFL_{DNA} の蛍光強度比変化をモニターすることで、pH 測定が行えることが明らかとなった。hoeFL_{DNA} の最適な pH 測定条件を検討するために、hoeFL_{DNA} の Hoechst 部位の吸収ピークである 350 nm を励起した際の pH 応答についても評価を行った。350 nm の励起光を用いた場合では、pH の減少に伴い 480 nm の蛍光強度 (F_{480}) はわずかに増大するのみで、 F_{520} が顕著に増大した (図 39)。pH 変化に対する蛍光強度比 (F_{520}/F_{480}) の変化を図 40b に示した。本結果より、hoeFL_{DNA} を 350 nm で励起しても、蛍光強度比変化に基づく pH 測定が行えることが示された。350 nm と 405 nm の 2 種類の励起波長を用いた際の pH 応答能を比較すると、pH 変化に対する蛍光強度比の変化は、405 nm 励起時の方が大きいことが明らかとなった (図 39b, 図 40b)。したがって、本研究では hoeFL の励起光として 405 nm 光を用いることにした。

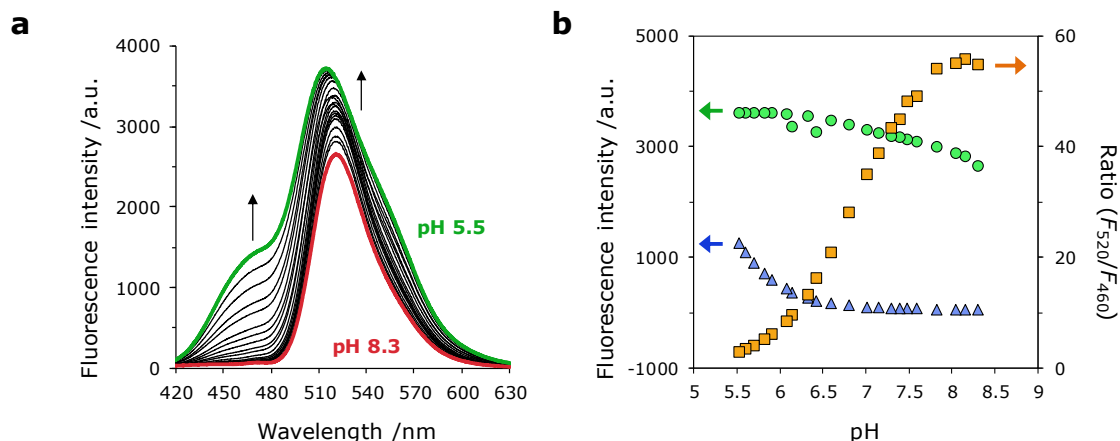


図 39 励起波長の検討 ($\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$) : (a) hoeFL_{DNA}: pH 変化に対する蛍光スペクトルの変化 (2 μM hoeFL, 24 μM hpDNA, 50 mM MOPS, 100 mM NaCl, 20°C, pH 8.30→5.53) [8.30 (red line), 8.15, 8.04, 7.83, 7.59, 7.48, 7.39, 7.30, 7.15, 7.01, 6.81, 6.60, 6.42, 6.32, 6.14, 6.08, 5.91, 5.82, 5.70, 5.60 and 5.53 (green line)], (b) 各 pH における 460 nm と 520 nm の蛍光強度 (F_{460} , F_{520}) と蛍光強度比 (F_{520}/F_{460})

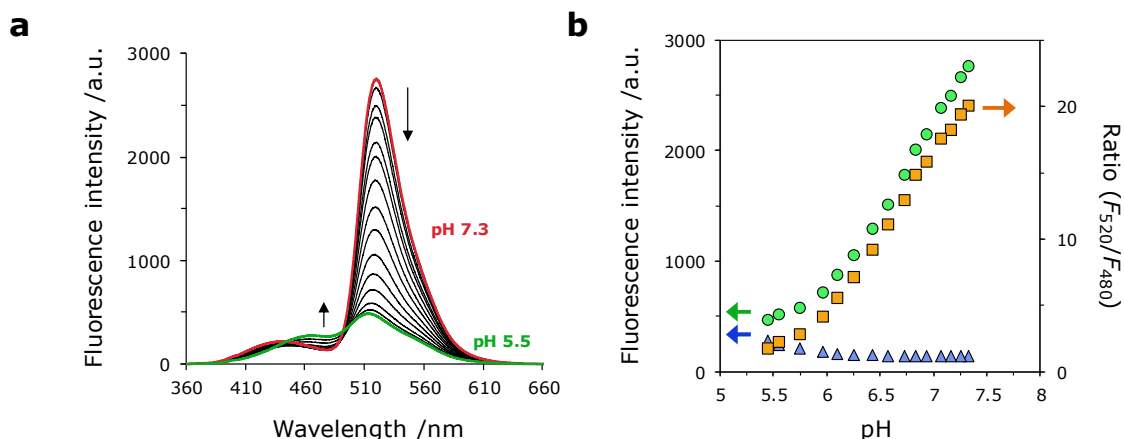


図 40 励起波長の検討 ($\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$) : (2 μM hoeFL, 24 μM hpDNA, 50 mM MOPS, 100 mM NaCl, 20°C, pH 7.3→5.5) [7.33 (red line), 7.25, 7.16, 6.93, 6.83, 6.73, 6.57, 6.43, 6.25, 6.1, 5.96, 5.74, 5.55 and 5.45 (green line)], (b) 各 pH における 480 nm と 520 nm の蛍光強度 (F_{480} , F_{520}) と蛍光強度比 (F_{520}/F_{480})

3.2.3 hoeFLDNA の pH 応答メカニズム

hoeFLDNA の pH 応答メカニズムを検討するために、hoeFLDNA の各 pH における吸収スペクトルを取得した (図 42)。さらに、第二章で用いた hoeBoc と FL をコントロール化合物として用意し、各 pH における hoeBocDNA と FL の蛍光/吸収スペクトルを取得した (図 13c, 図 43)。hoeBocDNA と FL の蛍光/吸収スペクトルより、hoeFLDNA の pH 低下に伴い増大する 460 nm の蛍光は Hoechst 部位に由来し、強度が殆ど変化しない 480 nm 蛍光は、FL 部位に由来することが明らかとなった (図 43b, d)。hoeBocDNA の吸収スペクトルに着目すると、pH 低下に伴い吸収ピークがレッドシフトすることで、405 nm の吸光度が増大している (図 43a)。Hoechst は、pH 低下に伴い benzimidazole 部位の窒素 (N27) にプロトンが付加することが報告されている (図 41) [3-6a, b]。したがって、hoeBocDNA も同様に pH 低下に伴いプロトンの付加が起きていると考えられる。これらの結果より、hoeBocDNA の pH 低下に伴う蛍光強度の増大は、プロトン付加による 405 nm の吸光度の増大に起因するものと考えられる。一方で、FL を 405 nm 励起した際の蛍光強度 (460 nm) は、pH が変化してもほぼ一定の値を示した (図 43d)。

次に、hoeFLDNA の pH 応答機構をさらに検討するために、hoeBocDNA と FL (hoeBoc-FLDNA) を緩衝液に溶解し、各 pH における吸収/蛍光スペクトルを取得し、pH 変化に伴う蛍光強度 (F_{520} , F_{460}) の変化を調べた (図 44)。hoeBoc, hpDNA, FL のモル濃度は、hoeFLDNA の測定条件 (図 39) と一致させた。この濃度条件下では、hoeFLDNA と hoeBoc-FLDNA の吸収スペクトルは殆ど一致することが明らかとなった (図 44a)。hoeBoc-FLDNA の蛍光スペクトルより、pH 低下時に FL 蛍光 F_{520} と Hoechst 蛍光 F_{460} は、いずれも顕著に増大した。 (図 44b)。hoeBoc-FLDNA を構成する hoeBocDNA は、pH の低下に伴い蛍光強度が顕著に増大することに対し (図 43b)、FL はほぼ一

定の蛍光強度を示す (図 43d)。したがって、**hoeBoc-FLDNA** の pH 低下に伴う F_{520} と F_{460} の増大は、**hoeBocDNA** の蛍光強度の増大に由来するものであると考えられる。一方で **hoeFLDNA** では、pH の低下により Hoechst 部位の蛍光 F_{460} は増大するが、FL 部位の蛍光 F_{520} はほぼ一定である (図 39a)。したがって、**hoeFLDNA** では、Hoechst 部位の蛍光と FL 部の吸収スペクトルの重なりに起因する蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET: fluorescence resonance energy transfer) が起きており、その FRET 効率は、pH 低下に伴い低くなることで FL 蛍光 F_{520} が一定に保たれるものと考えられる。また、**hoeFLDNA** における Hoechst 蛍光 F_{460} は、**hoeBoc-FLDNA** の F_{460} よりも常に低く、また pH 低下に伴い (FL 部位への FRET の効率が低下し) Hoechst 蛍光 F_{460} が顕著に増大することからも **hoeFLDNA** の Hoechst 部位と FL 部位間で FRET が起きていると考えられる。この **hoeFLDNA** の pH 応答の機構は複雑であるものの、**hoeBoc-FLDNA** と **hoeFLDNA** の各 pH における蛍光強度比 (F_{520}/F_{460}) (図 44c) の比較により、pH 変化に伴う F_{520}/F_{460} の変化は、**hoeFLDNA** の方が大きく、さらに生理的な pH 変化を十分に測定できることが明らかとなった (図 39b, 図 44c)。

以上の結果より、**hoeFLDNA** の pH 測定は、FL 蛍光が内部標準とした、Hoechst 蛍光の増減の定量化によって達成できることが明らかとなった。**hoeFLDNA** の FL 蛍光が pH 変化に依存せず一定に保たれる機構は、Hoechst 部位と FL 部位間の FRET と、pH 変化に伴う FRET 効率の変化が関与する複雑なものであることが示唆された。その一方で、**hoeFLDNA** は、生理的 pH 変化 (pH 5.0-8.0) を測定できることが明らかとなった。

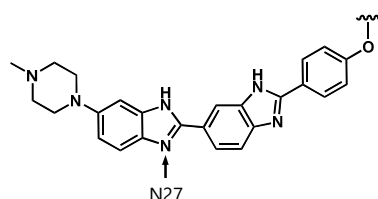


図 41 pH 5.0-8.0 においてプロトンが付加する Hoechst の N27 の位置

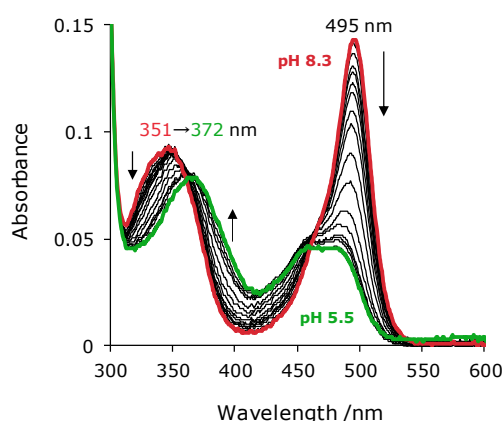


図 42 **hoeFLDNA**: 各 pH における吸収スペクトル (2 μ M **hoeFL**, 24 μ M hpDNA, 50 mM MOPS, 100 mM NaCl, 20°C, pH 8.30→5.53) [8.30 (red line), 8.15, 8.04, 7.83, 7.59, 7.48, 7.39, 7.30, 7.15, 7.01, 6.81, 6.60, 6.42, 6.32, 6.14, 6.08, 5.91, 5.82, 5.70, 5.60 and 5.53 (green line)]

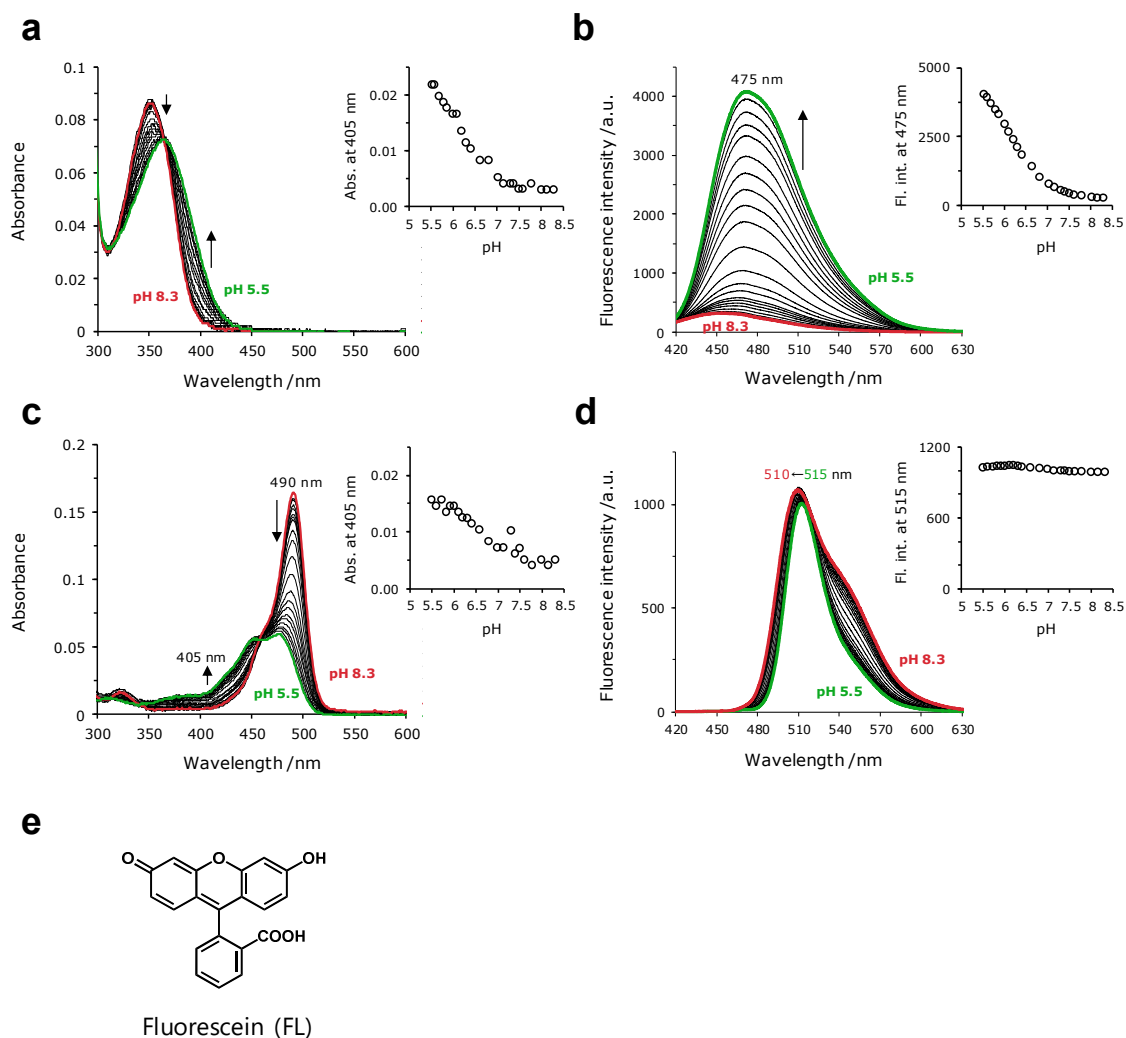


図 43 hoeBocDNA と fluorescein の各 pH における吸収／蛍光スペクトル;

hoeBocDNA: (a) 吸収スペクトル, (b) 蛍光スペクトル ($\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$) , (a, b)の測定条件: (2 μM **hoeBoc**, 4 μM hpDNA, 50 mM MOPS, 100 mM NaCl, 20°C, pH 8.3→5.5) [8.3 (red line), 8.14, 8.02, 7.79, 7.60, 7.50, 7.39, 7.31, 7.15, 7.03, 6.82, 6.63, 6.41, 6.30, 6.20, 6.10, 5.87, 5.80, 5.69, 5.59 and 5.53 (green line)]

Fluorescein: (c) 吸収スペクトル, (b) 蛍光スペクトル ($\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$) , (c, d)の測定条件: (2 μM fluorescein, 50 mM MOPS, 100 mM NaCl, 20°C, pH 8.3→5.5) [8.31 (red line), 8.15, 7.99, 7.78, 7.61, 7.50, 7.39, 7.30, 7.13, 6.99, 6.80, 6.59, 6.40, 6.30, 6.20, 6.10, 5.91, 5.82, 5.73, 5.60 and 5.50 (green line)], (e) Fluorescein (FL)の分子構造

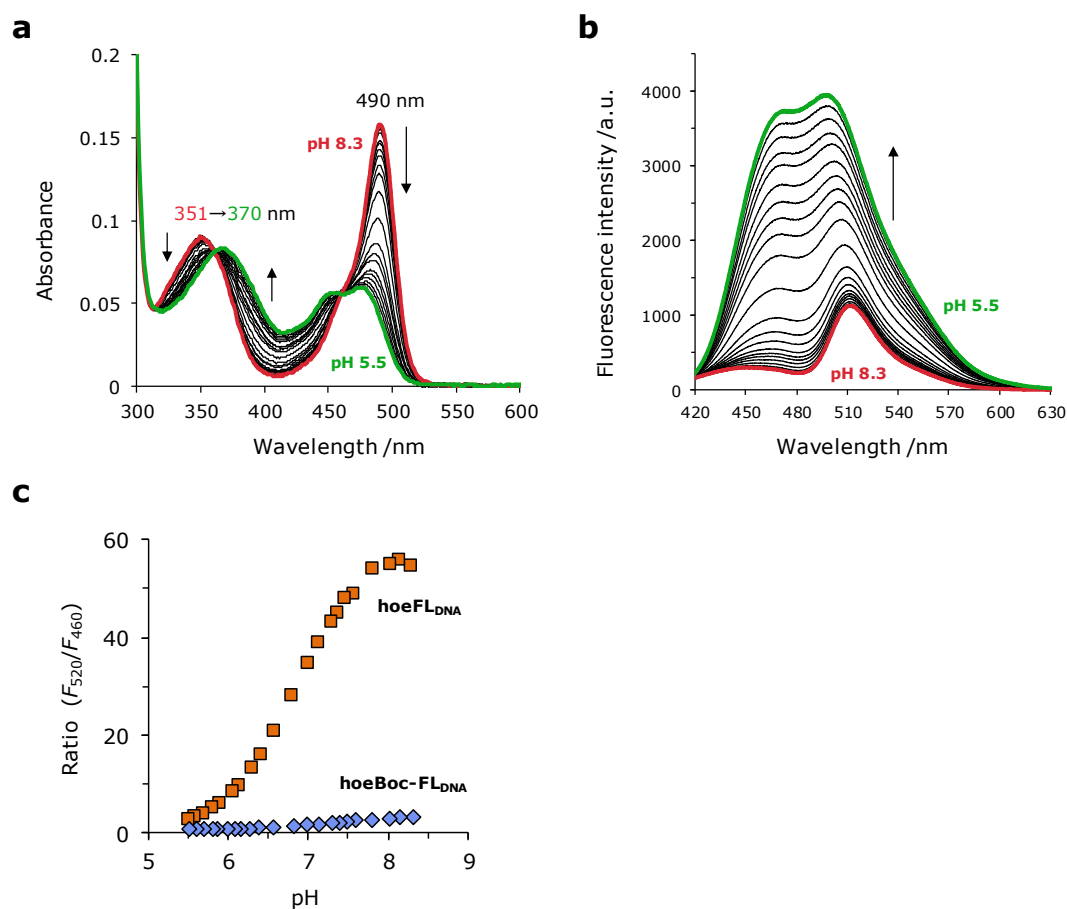


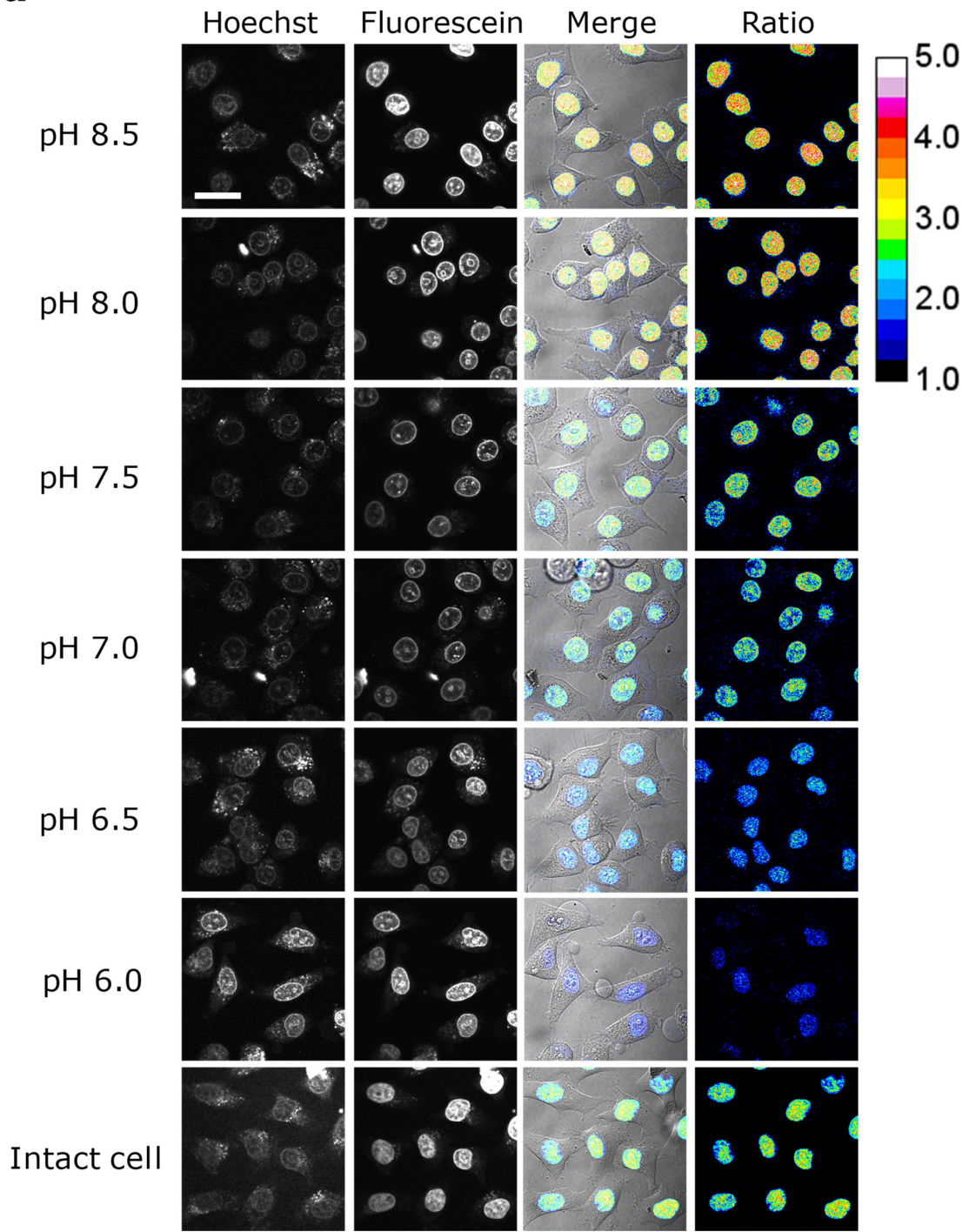
図 44 hoeBoc-FLDNA: (a, b) 各 pH における吸収 / 蛍光スペクトル ($\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$) ($2 \mu\text{M}$ hoeFL, $24 \mu\text{M}$ hpDNA, 50 mM MOPS, 100 mM NaCl, 20°C , pH 8.30 \rightarrow 5.53) [8.30 (red line), 8.15, 8.04, 7.83, 7.59, 7.48, 7.39, 7.30, 7.15, 7.01, 6.81, 6.60, 6.42, 6.32, 6.14, 6.08, 5.91, 5.82, 5.70, 5.60 and 5.53 (green line)], (c) hoeFLDNA と hoeBoc-FLDNA の各 pH における蛍光強度比 (F_{520}/F_{460})

3.2.4 細胞実験

次に、**hoeFL** を用いることで、生細胞（HeLa 細胞）の核内選択的 pH 測定を試みた。**hoeFL** の細胞膜透過性は低いため、細胞膜透過性の高い **hoeAc2FL** を細胞培養液に添加することで生細胞の核内に **hoeFL** を導入した。核内 pH の測定のために、**hoeFL** の蛍光強度比と核内 pH を対応付けるための検量線を作成した。検量線の作成は、 K^+/H^+ -ionophore である nigericin と高濃度 K^+ を含有する緩衝液を用いることで細胞内 pH を調節し、**hoeFL** の Hoechst 蛍光と FL 蛍光を取得することで行った。観察には共焦点レーザー顕微鏡（Ex. 405 nm）を使用し、430-510 nm 蛍光を Hoechst 蛍光（ $F_{430-510}$ ）、520-620 nm 蛍光を FL 蛍光（ $F_{520-620}$ ）として取得した。観察結果より、細胞内 pH の低下（pH 8.5→6.0）に伴い、核局在化 **hoeFL** の Hoechst 蛍光が増大し、FL の蛍光はほぼ一定の値を示した（図 45a, b）。蛍光強度比（ $F_{520-620}/F_{430-510}$ ）は、pH 6.0-8.5 の間で顕著に変化し、**hoeFL** が核内においても pH 変化に応答することが明らかとなった（図 45a, b）。さらに、細胞実験より取得した結果は、*in vitro* において **hoeFL**_{DNA} の pH 応答を顕微鏡観察時と同一条件で評価した結果と一致し、**hoeFL** が核内においても *in vitro* と同じメカニズムで pH 応答していることが示唆された（図 45b, c）。上記の手順で得た検量線を基に、HeLa 細胞（intact cell）の核内 pH を測定した。その結果、核局在化 **hoeFL** の蛍光強度比（ $F_{520-620}/F_{430-510}$ ）は 2.8 を示し、HeLa 細胞の核内 pH を 7.4 と見積もることができた。本結果は、過去に報告された HeLa 細胞の核内 pH と一致した^[3-8]。さらに、intact cell の核内の **hoeFL** シグナルを詳細に解析すると、核内の pH が均一ではないことが示された（図 45a）。

以上の結果より、**hoeFL**/**hoeAc2FL** を用いることで、生細胞の核内選択的な pH 測定技術を確立することに成功した。

a



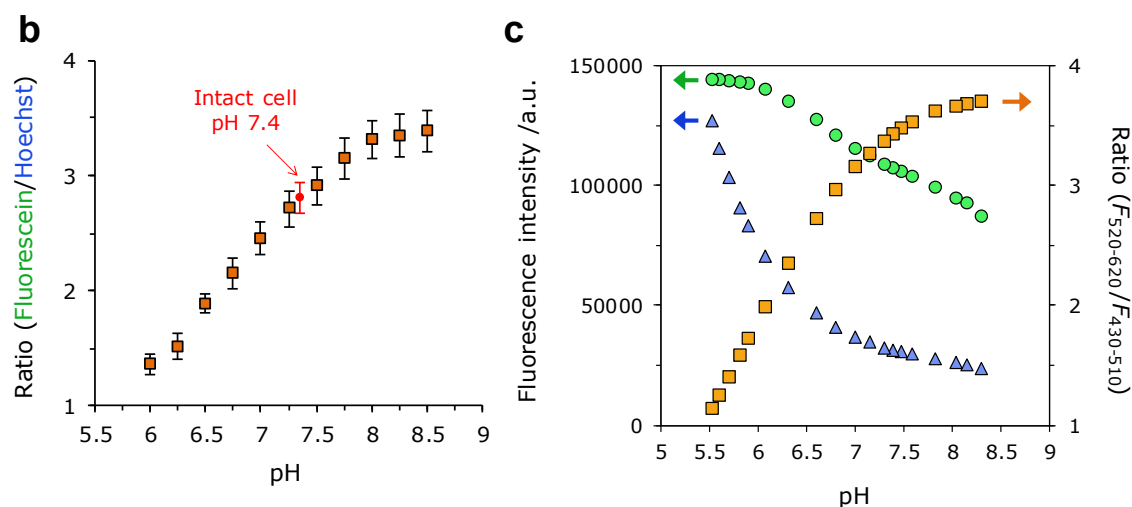


図 45 hoeAc₂FL を用いた HeLa 細胞の核内選択的 pH 測定; (a) 共焦点レーザー顕微鏡観察 (Ex. 405 nm) による各 pH における Hoechst 蛍光 ($F_{430-510}$) と fluorescein 蛍光 ($F_{520-620}$) および 蛍光強度比 ($F_{520-620}/F_{430-510}$) ; 細胞内 pH は nigericin を用いて調節した (3.7 実験方法参照) , (b) (a) の観察結果に基づく pH 測定用の検量線と intact cell の核内 pH 測定結果, (c) (a) に示した蛍光検出条件で各 pH における hoeFL_{DNA} の蛍光強度比を *in vitro* で評価した結果 ($\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$)

3.5 結論

本章では、第二章で開発した核局在性 fluorescein (hoeFL/hoeAc₂FL) を構成する Hoechst と FL が pH 応答性の蛍光色素であることに着目し、hoeFL を用いた核内選択的な pH 測定技術の開発に取り組んだ。hoeFL の DNA 結合能は、生理的な pH 変化 (pH 6.0-8.0) において殆ど変動しないことを明らかにした。hoeFL-hpDNA 複合体 (hoeFL_{DNA}) を 405 nm で励起し、pH を低下させると、Hoechst 蛍光の強度が顕著に増大し、FL 蛍光の強度は殆ど変化しないことが明らかとなった。さらに、hoeFL_{DNA} の Hoechst 蛍光と FL 蛍光の強度比は、pH 5.5-8.3 レンジにおいて顕著に変化し、hoeFL_{DNA} が蛍光強度変化に基づく pH 測定が行えることを実証した。

hoeFL_{DNA} の pH 応答機構は、Hoechst 部位のプロトン付加や、Hoechst 部位と FL 部位間の FRET と FRET 効率の pH 依存的な変化が関係する複雑なものであることが示唆されが、hoeFL_{DNA} は生理的な pH 変化を十分に測定できることが明らかとなった。さらに、hoeFL は、生細胞の核内においても *in vitro* と同様の pH 応答性を示し、核内選択的な pH 測定技術の確立に成功した。さらに、hoeFL を用いた核内 pH 測定により、核内の pH 分布が均一ではないことが示された。

以上の結果より、hoeFL/hoeAc₂FL を用いることで、生細胞の核内選択的な pH 測定技術を確立することに成功した。本成果は、Hoechst 連結法が、蛍光プローブを用いた核内の環境のリアルタイム解析や分子プロセス解析を核内特異的にを行うための強力な基盤技術となることを裏付けるものであると考えられる。

3.6 実験方法

hoeFL の各 pH における DNA 結合能・光化学特性の解析条件

スペクトル測定は、1 cm 石英キュベットセルを用いて行った。吸収スペクトルと蛍光スペクトルは、分光光度計と分光蛍光光度計を用いて取得した(Hitachi U-3900H, Hitachi F-7000)。緩衝液の調製は、超純水 (Sartorius Arium Pro DI ultrapure water system) を用いて行った。Hoechst 連結 fluorescein (**hoeFL**) は、1 mM DMSO ストックを調製した。28 mer hpDNA は、オペロンバイオテクノロジーより購入した。hpDNA は超純水に溶解して 1 mM ストック溶液を調製し、滴定実験に使用した。解離定数 K_D は、Hoechst 連結蛍光プローブと hpDNA が 1:1 で結合しているものとして導出した。

hoeFL の各 pH における DNA 結合能・光化学特性の解析条件

hoeFL-hpDNA 複合体 (**hoeFL**_{DNA}) を MOSP buffer (50 mM MOPS, 100 mM NaCl, pH 8.3) に溶解させた。その後、1 M HCl を用いて pH を調節し、20°C で各 pH における蛍光/吸収スペクトルを取得した。コントロール化合物である **hoeBoc**-hpDNA 複合体 (**hoeBoc**_{DNA}) と fluorescein についても同様にして蛍光/吸収スペクトルを取得した。

*MOPS: 3-Morpholinopropanesulfonic acid

細胞培養条件

HeLa 細胞は、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン、10% 非働化ウシ胎児血清を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を用いて、5% CO₂、37°C で培養した。**hoeAc2FL** の細胞内導入を行う際は、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシンを含み、フェノールレッドと血清を含まない DMEM (DMEM_i) を使用した。

共焦点レーザー顕微鏡観察を用いた核内 pH 測定条件

35 mm ガラス底ディッシュ (AGT Techno Glass) に HeLa 細胞を播種し、5% CO₂、37°C で 24 h 培養した。その後、DMEM_i で 2 度洗浄を行い、終濃度 5 µM で **hoeAc2FL** を添加し、5% CO₂、37°C で 15 min インキュベーションを行った。その後、各 pH に調節した nigericin buffer (10 mM MOPS, 130 mM KCl, 10 mM NaCl, 1 mM MgSO₄) で 2 回洗浄した後、10 µg/mL nigericin を添加し 5% CO₂、37°C で 20-30 min インキュベーションを行い、共焦点レーザー顕微鏡観察を行った。図 45a, b に記した intact cell は、nigericin 処理は行わず DMEM_i で 2 回洗浄し、共焦点レーザー顕微鏡観察を行うことで取得した。取得した蛍光像の解析は、Image J (National Institute of Health) を用いて行った。

3.7 参考文献

- [3-1] Casey J.R. *et al.*, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 50 (2010)
- [3-2] Francastel C. *et al.*, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 137 (2000)
- [3-3] (a) Santos J.M. *et al.*, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **311**, C547 (2016), (b) Seksek O. and Bolard J., *J. Cell Sci.* **109**, 257 (1996), (c) Masuda A. *et al.*, *Brain Res.* **807**, 70 (1998), (d) Johnson I. and Spence M.T.Z., *The Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, 11th edn, ch. 8.1 and 12.5 (2010)
- [3-4] Sherman T.A. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta.* **1823**, 808 (2012)
- [3-5] Benink H.A. *et al.*, *BioTechniques.* **47**, 769 (2009)
- [3-6] (a) Kalnins K.K. *et al.*, *Photochem. Photobiol. A: Chem.* **83**, 39 (1994), (b) Gerner H., *Photochem. Photobiol.* **73**, 339 (2001), (c) Banerjee D. and Pal S.K., *Chem. Phys. Lett.* **432**, 257 (2006)
- [3-7] Klonis N and Sawyer W.H., *J. Fluores.* **6**, 147 (1996)
- [3-8] Llopis J. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Chem. U. S. A.* **95**, 6803 (1998)

第四章 細胞膜内膜を標的とした自己局在性小分子リガンドの開発と 細胞内シグナル独立制御技術の開発

4.1.序

生存・運動・増殖といった細胞機能は、細胞内タンパク質が関与した連鎖反応系（シグナル伝達）によって精密に制御されている。細胞膜表層の受容体に増殖因子が結合すると、その下流で複数のタンパク質が一斉に活性化し、シグナル伝達経路を構成することでさまざまな細胞機能が制御される（図 46a）^[4-1]。ここで、もし合成性分子リガンドを用いて、特定のタンパク質を（受容体を介さずに）選択的に活性化することが可能になれば、シグナル伝達経路と細胞機能との関係を詳細に調べるための強力な分子ツールになるものと考えられる（図 46b）。しかし、現在のリガンド化合物の開発は、タンパク質に結合しその活性をオフにする「阻害剤」に一辺倒である。真に細胞機能を制御するためには、タンパク質活性を人工的にオンにするリガンド化合物（活性化剤）の開発が必要となる。さらに、細胞内は分子プロセスを適切に進行させるための区画領域・オルガネラをもち、領域毎に異なるタンパク質と固有のシグナル伝達経路を有している^[4-2]。したがって、精密な細胞機能制御を達成するためには細胞内の区画領域・オルガネラに自発的に局在化（集積）するリガンド化合物の開発が重要となる。しかし、従来のライブラリーを用いたリガンドスクリーニングに代表される手法では、タンパク質とリガンドの結合（相互作用）のみが検出対象であるため、上記のような局在性を有する（活性化剤を含む）リガンド化合物の取得は困難である。したがって、細胞内シグナルを精密かつ自在に制御するためのリガンド化合物の創製には、従来のリガンド化合物とは全く異なる分子設計戦略が必要になるものと考えられる。

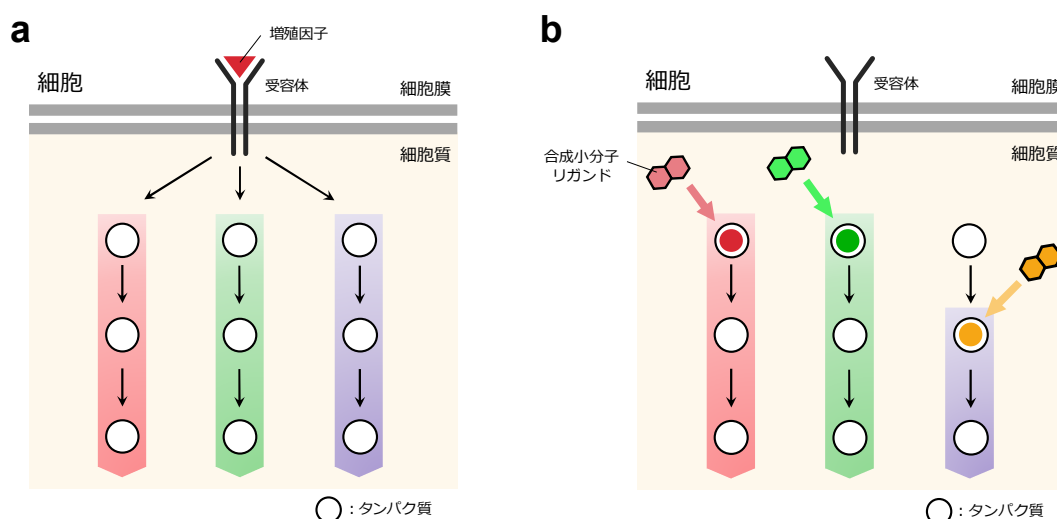


図 46 (a) 受容体を介したシグナル伝達経路の活性化の概略図
(b) 合成性分子リガンドを用いた受容体非依存的なシグナル伝達経路の活性化

4.1.1 タンパク質の細胞膜内局在化に基づく細胞内シグナルの活性制御機構

細胞膜内局在化は受容体に直結した領域であり、受容体の下流に位置するシグナル伝達経路の多くは、この細胞膜内局在化を起点に活性化される。細胞膜内局在化を起点に活性化されるシグナル伝達経路の一例として、Ras/ERK 経路に注目する。Ras/ERK 経路は、増殖・分化・運動といった細胞機能の恒常性を保つ上で欠かすことのできない多くの細胞機能を制御することが知られている^[4-1]。受容体を介した Ras/ERK 経路の活性化は、まず、上皮増殖因子 (EGF) 受容体の細胞外ドメインにリガンドである EGF が結合し EGF 受容体が二量体を形成する。この二量体化により、EGF 受容体の細胞内ドメインの立体構造変化が起こり、細胞内ドメインのチロシンキナーゼが活性化されて二量体を形成している EGF 受容体同士でチロシン残基のリン酸化を行う。受容体の細胞質ドメインがリン酸化されるとアダプタータンパク質である GRB2 が結合して Ras のグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) が細胞質から細胞膜内局在移行し、細胞膜内局在化の上の Ras-GDP が活性型の Ras-GTP に変換される。活性化した Ras は二量化した後に、Serine/Threonine kinase キナーゼである Raf の細胞膜内局在化を誘導する。細胞膜内局在化の上で Raf は二量体化形成することで活性化し、下流の MEK と ERK を活性化する。活性化した ERK は、二量体を形成し細胞質から核内へ移行する。核内局在化した ERK は、核内で転写因子群を活性化し、タンパク質合成を促すことで増殖、分化、運動といった細胞機能を制御する。

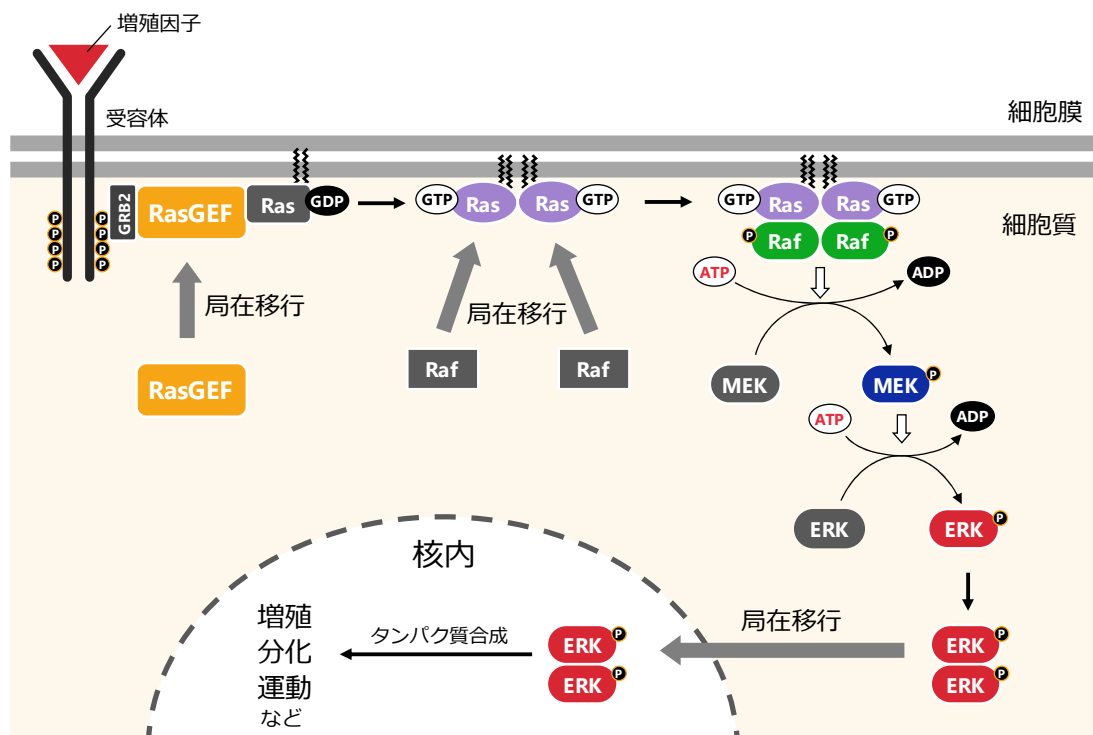


図 47 Ras/ERK 経路の概略図

この Ras/ERK 経路の活性化メカニズムにおいて注目したいのが、RasGEF や Raf といったシグナルタンパク質の細胞膜内膜局在化が下流への情報伝達の起点となっている点である。タンパク質の細胞質から細胞膜内膜への局在移行は、細胞を直径 20 μm の球体と考えたときに細胞膜内膜上でタンパク質を約 700 倍に濃縮し、細胞膜内膜上に局在化している (Ras/ERK 経路では Ras に該当する) タンパク質を活性化させることで、あるいは (Raf のように) 細胞膜内膜上でコンフォメーションを変化させることで下流のシグナルを活性化する^[4-2]。このタンパク質の細胞膜内膜局在化に基づくシグナル活性化は、Ras/ERK 経路に限らず PI3K/Akt 経路や Rho/Rac 経路といった非常に多くのシグナル伝達経路の情報伝達機構として知られている^[4-2c]。したがって、細胞膜内膜は、細胞内情報伝達のための非常に重要な領域 (反応場) であり、細胞膜内膜へのタンパク質の局在移行は細胞内シグナルのオン/オフを制御する極めて重要な機構であると考えられる。

4.2 目的

シグナル活性化因子である RasGEF や Raf といったタンパク質は、4.1.1 項の図 47 に示したように、受容体の増殖因子結合に伴う自己リン酸化を認識することで細胞膜内膜へ局在化し、下流へとシグナルを伝搬することで活性化する。そこで、もし小分子リガンド化合物を用いてタンパク質を細胞膜内膜に局在化する (濃縮する) ことができれば、細胞膜内膜を起点とする核内へ伝搬するシグナル伝達経路を人工的に活性化するための強力な手法になるものと考えられる。しかし、4.1 項に記したように小分子リガンドの開発においては、リガンドとタンパク質との結合に焦点が絞られており、細胞膜内膜 (iPM: inner-leaflet of plasma membrane) にリガンド化合物を選択的に配置するための分子設計戦略は、未だ発展途上の段階である。

本章では、iPM に自発的局在化するリガンド化合物 (iPM 局在性リガンド) を開発するための汎用的な分子設計戦略を確立し、iPM 局在性リガンドによる細胞内タンパク質の iPM 局在移行誘導に基づいた細胞内シグナル伝達経路の人工活性化システムの開発を目指した。

4.3 結果

4.3.1 iPM 局在性リガンドの開発とタンパク質の局在移行制御に基づく細胞内シグナルの制御

筆者は、第二章の Hoechst 連結法と同様に、iPM に自発的に局在化する小分子化合物を iPM 局在化タグとして小分子リガンド化合物に連結することで、iPM 局在性リガンドが創製できるものと考えた。具体的には、iPM 局在性を示す Src ファミリータンパク質の N 末端モチーフである「ミリスチン酸—グリシン(Gly)—システイン(Cys)」から成る脂質化ペプチドを iPM 局在化タグ (mgc タグ) として見出した。mgc タグは、細胞内のゴルジ体において S-パルミトイルアシル転移酵素 (PAT: palmitoyl acyltransferase) によってシステイン側鎖にパルミトイル基修飾 (パルミトイル化) を受け iPM に局在化する^[4-5]。そこで、この mgc タグを大腸菌由来のジヒドロ葉酸還元酵素 (eDHFR) に特異的に結合するリガンド化合物である TMP (trimethoprim) に連結することで、iPM 局在性 TMP リガンド (mgcTMP) を設計・合成した (図 48)^[4-4]。次に、TMP の標的タンパク質である eDHFR に緑色蛍光タンパク質 (GFP) を連結した eDHFR-GFP を発現させた細胞を用意した。mgcTMP 添加前は、eDHFR-GFP は核内を含め細胞全体を拡散する。mgcTMP を細胞培養液に添加すると、蛍光パターンが大きく変わり eDHFR-GFP が iPM (と一部ゴルジ体) に移行する様子が観察された (図 49b)。本結果より、mgcTMP がそれ単体で iPM へ局在化するだけでなく、eDHFR を細胞質から iPM へ連行し、そこにアンカリングできることを実証した (図 49b)。

次に、4.1.1 項で紹介した Ras/ERK 経路を標的としたシグナル伝達経路の人工制御技術の開発を試みた。Ras/ERK 経路は、RasGEF の細胞質から iPM への局在移行により iPM 上の Ras が GDP 型から GTP 型に変換されることで活性化する^{[4-1][4-2b]}。そこで、eDHFR に RasGEF を連結した人工タンパク質の iPM 局在化を mgcTMP を用いて誘導することで、(受容体の活性化非依存的に) Ras/ERK 経路の人工活性化が可能になるものと考え、eDHFR に Ras/ERK 経路の活性化因子である RasGEF (SOScat: son of sevenless homologue 1 の触媒活性ドメイン^[4-6a]) と蛍光観察用の mCherry を連結した mCherry-eDHFR-SOScat を設計し、HeLa 細胞に発現させた。Ras/ERK 経路の活性化は、活性化に伴い細胞質から核内に移行する ERK に蛍光観察用の GFP を融合した GFP-ERK を用いてモニターした^[4-6b]。mgcTMP 添加前は、GFP-ERK は細胞質に分布し Ras/ERK 経路がオフ状態であることを示した。ここに mgcTMP を添加すると mCherry-eDHFR-SOScat は iPM へ局在化し、ERK は核移行し Ras/ERK 経路の活性化を示した。また、フリーの TMP リガンドを用いて eDHFR と mgcTMP の結合を競合阻害した条件下で mgcTMP を添加すると、mCherry-eDHFR-SOScat の iPM 局在化は起こらず、ERK の核移行は促進されず、Ras/ERK 経路はオフ状態を維持した。これらの結果より、mgcTMP を用いた eDHFR 融合 RasGEF の iPM 局在移行誘導により Ras/ERK 経路の人工活性化システムを生細胞に構築することに成功した。

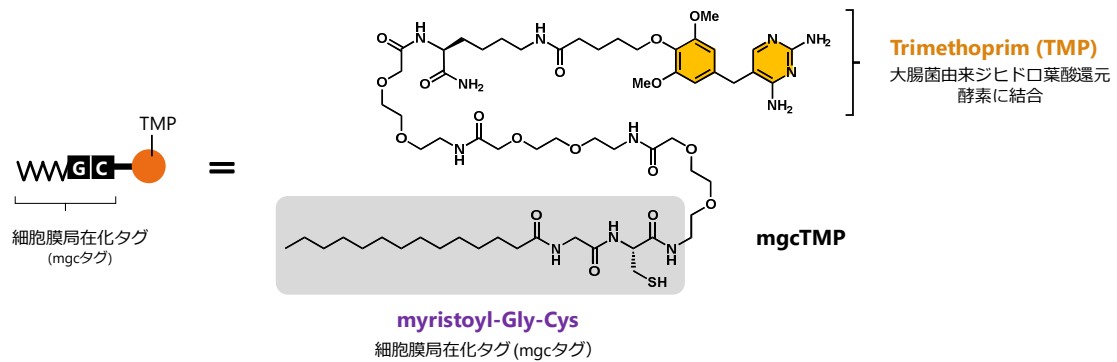


図 48 細胞膜内膜(iPM)局在性 TMP リガンド (**mgcTMP**) の分子構造

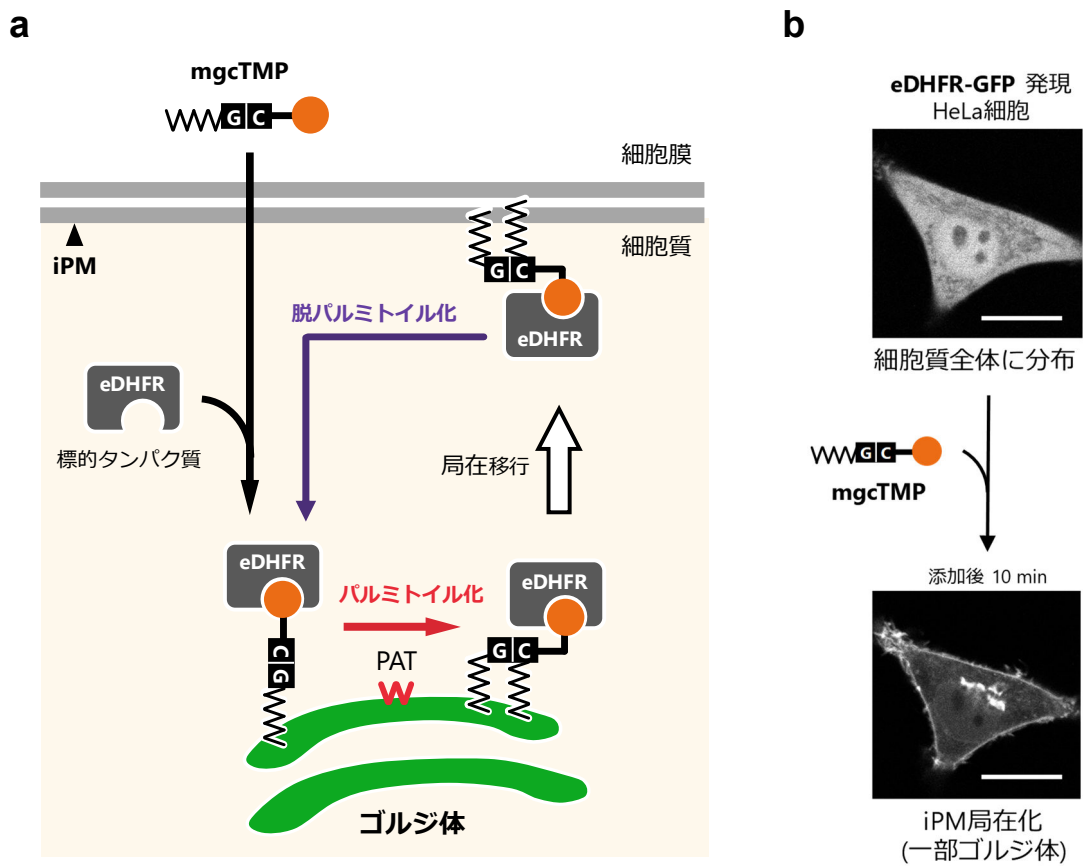


図 49 **mgcTMP** を用いた大腸菌由来ジヒドロ葉酸還元酵素 (eDHFR) の iPM 局在化;
(a) mgcTMP-eDHFR 複合体の iPM 局在化メカニズムの概略図,
(b) eDHFR-GFP 発現 HeLa 細胞における mgcTMP 添加前後の比較 (5 μ M **mgcTMP**) ,
共焦点レーザー顕微鏡観察; Ex. 488 nm, Em. 500-600 nm

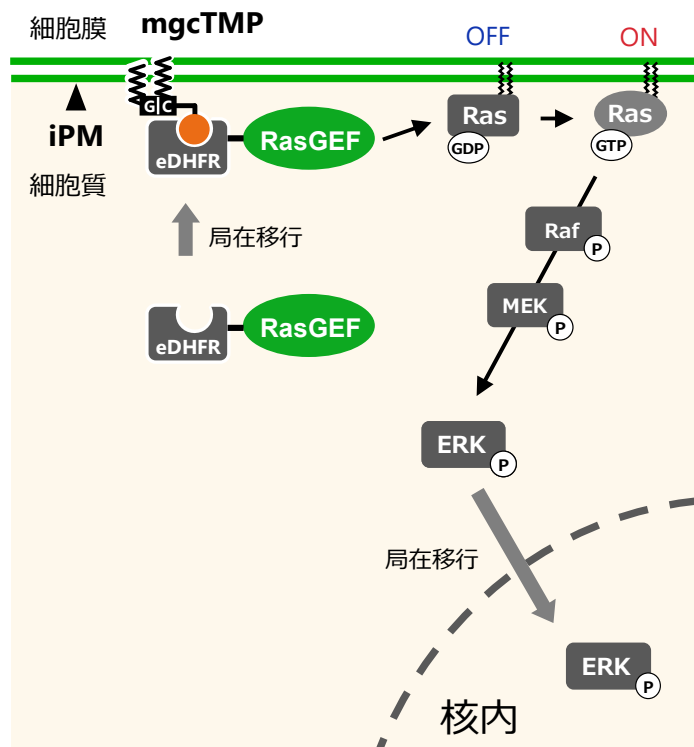


図 50 **mgcTMP** を用いた eDHFR 融合 RasGEF の iPM 移行誘導による Ras/ERK 経路の人工活性化の概略図

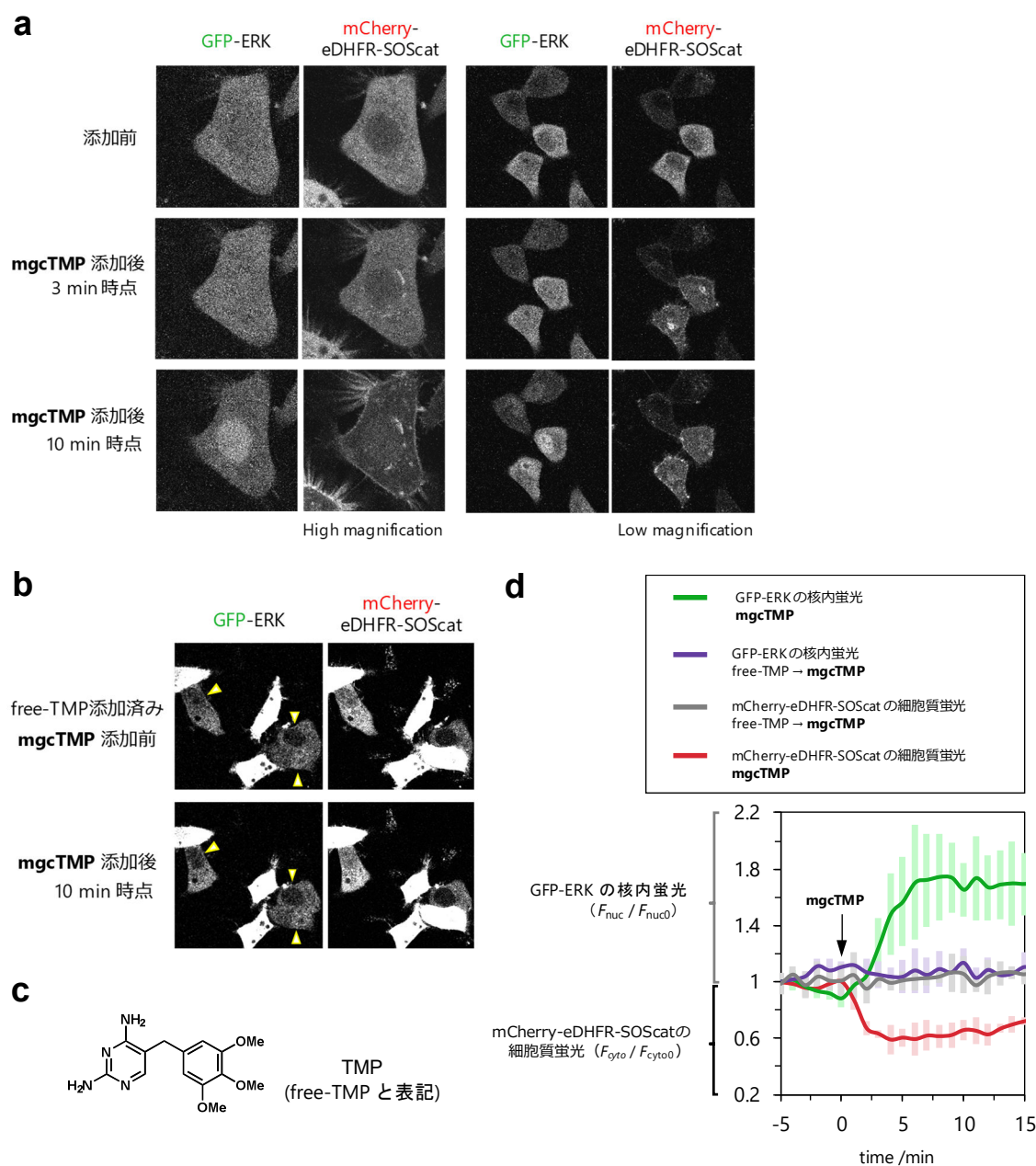


図 51 **mgcTMP** を用いた eDHFR 融合 RasGEF (SOScat) の iPM 局在移行制御に基づく Ras/ERK 経路の人工活性化システム; (a) mCherry-eDHFR-SOScat、GFP-ERK、MEK 共発現 HeLa 細胞における **mgcTMP** を用いた Ras/ERK 経路の人工活性化 (10 μ M **mgcTMP**) (b) free-TMP (100 μ M free-TMP, 5 min incubation) を予め添加しておき続けて **mgcTMP** を添加した結果 (10 μ M **mgcTMP**):黄色矢印は各細胞の核の位置を指し示している, (c) TMP の分子構造, (d) (a), (b)の各チャンネル蛍光の定量解析結果 (n = 3 cells, mean \pm s.d.) (矢印は mgcTMP 添加時間を示している)

共焦点レーザー顕微鏡観察; GFP channel: Ex. 488 nm, Em. 500-530 nm, mCherry channel: Ex. 543 nm, Em. 555-655 nm, zoom: 4x (a: High magnification), 2x (a: Low magnification, b)

4.3.2 SNAP タグラベル化システムを用いたタンパク質局在移行誘導システムの開発

受容体と増殖因子が結合することで多数のシグナル伝達経路が同時に活性化する^[4-1b]。一方で、**mgcTMP/eDHFR** システムは、受容体を介さないシグナル伝達経路の選択的な活性化を可能にし、単一のシグナル伝達経路と細胞機能の関係を調べることが可能になるものと考えられる。しかし、単一の細胞機能において、それを制御するシグナル伝達経路は一つではない。複数のシグナル伝達経路がフィードバックやクロストークにより複雑な情報伝達ネットワークを構築することで、細胞機能を複雑かつ緻密に制御している（図 52）^{[4-3][4-15b]}。したがって、より精密かつ高度な細胞機能制御やシグナル解析を達成するためには、単一細胞内で複数のタンパク質活性を独立に制御し、同時にその細胞応答をリアルタイムで追跡可能なシグナル制御技術の開発が重要であると考えられる。

本項では、**mgcTMP-eDHFR** と直交性を有する **iPM** 局在性リガンドおよびタンパク質移行誘導システムの新規開発と、それを用いた細胞内シグナルの人工活性化技術の確立を目指した（図 54）。そこで着目したのが、SNAP タグラベル化システムである。SNAP タグは、*O*⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase (AGT)を遺伝子工学的手法により改良した約 20 kDa のタンパク質タグであり、benzylchloropyrimidine (BCP)を基質として認識し、145 番目のシステイン側鎖に共有結合を介して結合する性質を有する（図 53）^[2-4]。SNAP タグと BCP の結合は、eDHFR と TMP の相互作用に対して直交性を有している。したがって、SNAP タグをベースとした **iPM** 選択的なタンパク質局在移行誘導システムを構築できれば、**iPM** を起点に活性化する 2 つのシグナル伝達経路を独立に制御することが可能になるものと期待できる（図 54）。

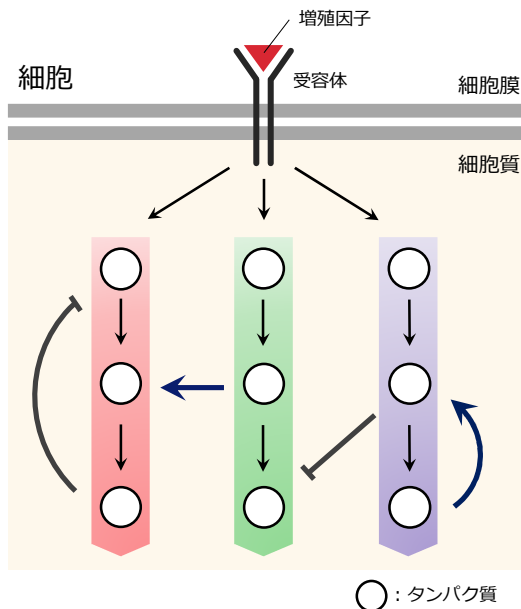


図 52 シグナル伝達経路はタンパク質間のクロストークやフィードバックにより複雑なネットワークを形成し細胞機能を緻密に制御する

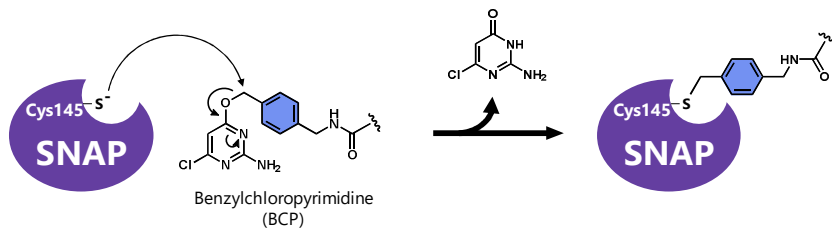


図 53 SNAP タグと benzychloropyrimidine (BCP) リガンドのラベル化反応の概略

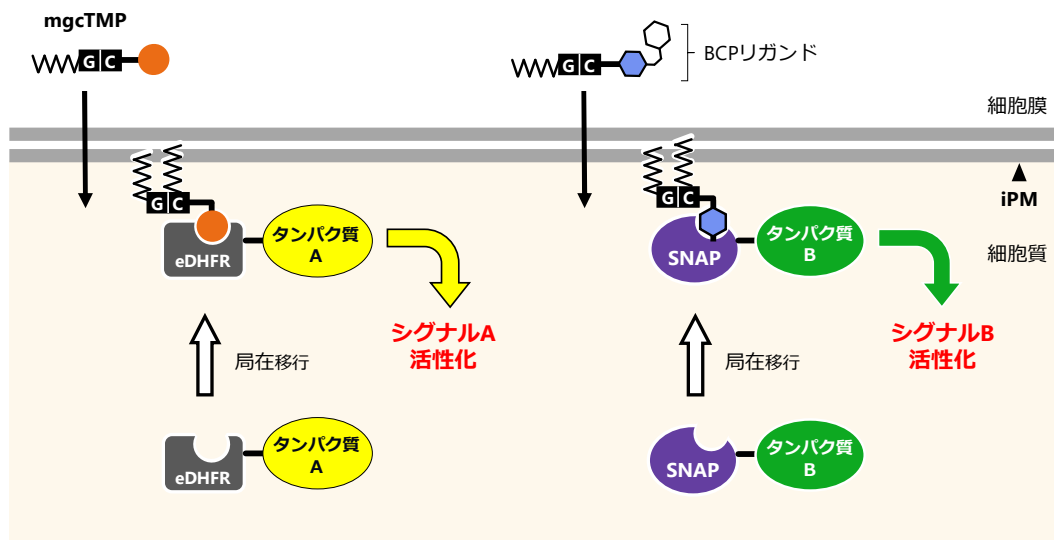


図 54 2 種類のタンパク質の局在移行誘導に基づくシグナル伝達経路の独立制御技術の概略

SNAP タグに対して特異的に結合する BCP リガンドを **mgcTMP** の TMP リガンドと置き換えることで、SNAP タグ用の iPM 局在性 BCP リガンドを設計合成できるものと考え、化合物 **6** を設計・合成した (図 55, 図 56a)。まず化合物 **6** が、SNAP タグの iPM 局在化を誘導できるかを評価するために SNAP タグに GFP を連結した人工タンパク質 (SNAP-GFP) を発現させた HeLa 細胞を用意した。化合物 **6** を細胞培養液に添加し、60 min インキュベーションの後に共焦点レーザー顕微鏡観察により SNAP-GFP の細胞内局在を評価した。観察の結果、SNAP-GFP は iPM ではなくゴルジ体に局在化していることが明らかとなった (図 56b, 図 57)。さらに、ゴルジ体と細胞質の GFP 蛍光の強度比 (F_{Golgi}/F_{Cyt}) から、SNAP-GFP のゴルジ体局在化が起きた細胞の割合を導出した結果、ゴルジ体に局在移行した細胞が全体の 34%と局在移行の効率が低いことが明らかとなった (図 57, 図 60)。これらの解析結果より明らかとなった問題点は次の 2 つである。① ゴルジ体局在化を示す細胞が少ない、② SNAP タグが iPM に局在化せずゴルジ体に局在化する。そこで、これらの問題に対して個別に解決策を講じることにした。本項では、まず①の SNAP-GFP がゴルジ体局在化を示す細胞の割合が低い問題の解決に取り組んだ。図 56b に示した SNAP タグの iPM 局在化のメカニズムを参考に、ゴルジ体局在化の効率が低い原因として次の 2 項目について検討した。

(1) 化合物 **6** の BCP リガンドと SNAP タグが結合していない

(2) 化合物 **6** と SNAP の複合体がゴルジ体膜に結合できない

(1)については、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) において、化合物 **6** と SNAP の複合体の移動度が SNAP タグ単独よりも小さくなることを利用したゲル内のバンドシフトにより、BCP リガンドと SNAP タグの反応効率を評価した。SNAP-GFP のバンド位置は、anti-GFP 抗体を用いた western blot により検出した。その結果、化合物 **6** と SNAP タグの結合率は 91%と見積もられ、化合物 **6** と SNAP タグの反応効率は極めて高いことが明らかとなり、(1) がゴルジ体局在化効率が低い原因ではないことが明らかとなった (図 62a lane 2, 3, 図 62c)。

続いて、(2)のゴルジ体膜に結合できない問題について考察し、化合物 **6** と SNAP 複合体とゴルジ体膜間の立体障害が大きく、ゴルジ体膜に結合できないことが原因である可能性を考えた。これらの問題を解決するために、化合物 **6** の mgc タグと BCP リガンドを結ぶスパーサーユニットである Adox (amino-3,6-dioxatanoic acid)に着目し、この Adox ユニットの数を (4 以上に) 増やしスパーサーを伸長することで、立体障害を緩和できるものと考えた。そこで、mgc-(Adox)_n-BCP の Adox を n = 4, 5, 6 とした化合物 **7, 8, 9** を新たに設計・合成した (図 58)。化合物 **7, 8, 9** はいずれも細胞膜透過性を有しており、BCP リガンド部位が高効率に SNAP タグと結合することが western blot により明らかとなった (図 62a lane 4-6, 図 62c, 図 61)。次に、これら化合物 **7, 8, 9** を用いて SNAP-GFP の局在移行誘導を行った結果、Adox スパーサーの伸長に伴い、ゴルジ体局在化を示す細胞の割合が 80% (化合物 **7**; Adox4)と大きく向上することが明らかとなった (図 59, 図 60, 図 61)。さらに、mgc-(Adox)_n-BCP を n = 5, 6 とした化合物 **8, 9** を用いた場合では、SNAP-GFP を発現するほぼ全ての細胞でゴルジ体局在化を確認することができた (図 59, 図 60, 図 61)。以上の結果より、SNAP-GFP の局在移行を高効率に誘導可能な局在性 BCP リガンドの開発

に成功した。以降の細胞実験には、**mgc-(Adox)₅-BCP** (**mgcBCP** と表記) を使用した。

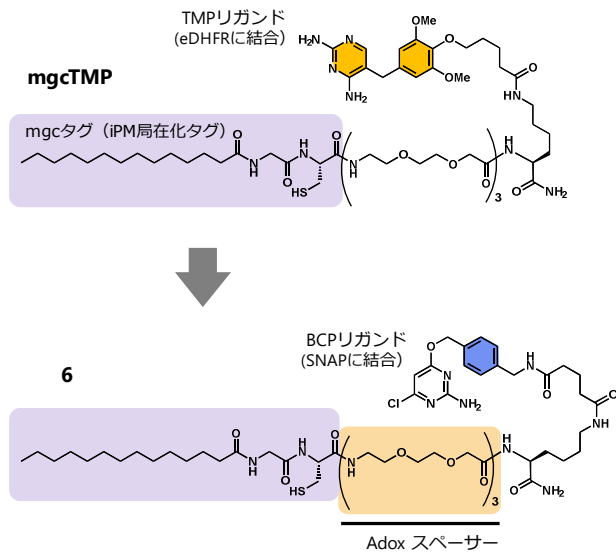


図 55 **mgcTMP** の分子設計に基づく SNAP タグ用の局在性 BCP リガンドの開発

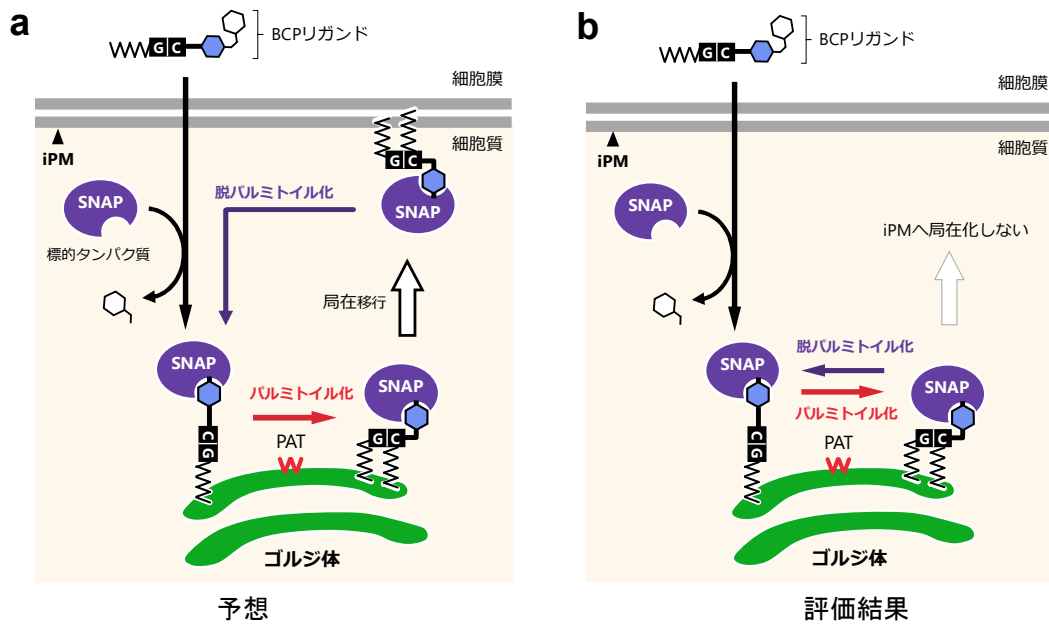


図 56 iPM 局在性 BCP リガンドを用いた SNAP タグの局在移行誘導の(a)予想と(b)実際 (評価結果)

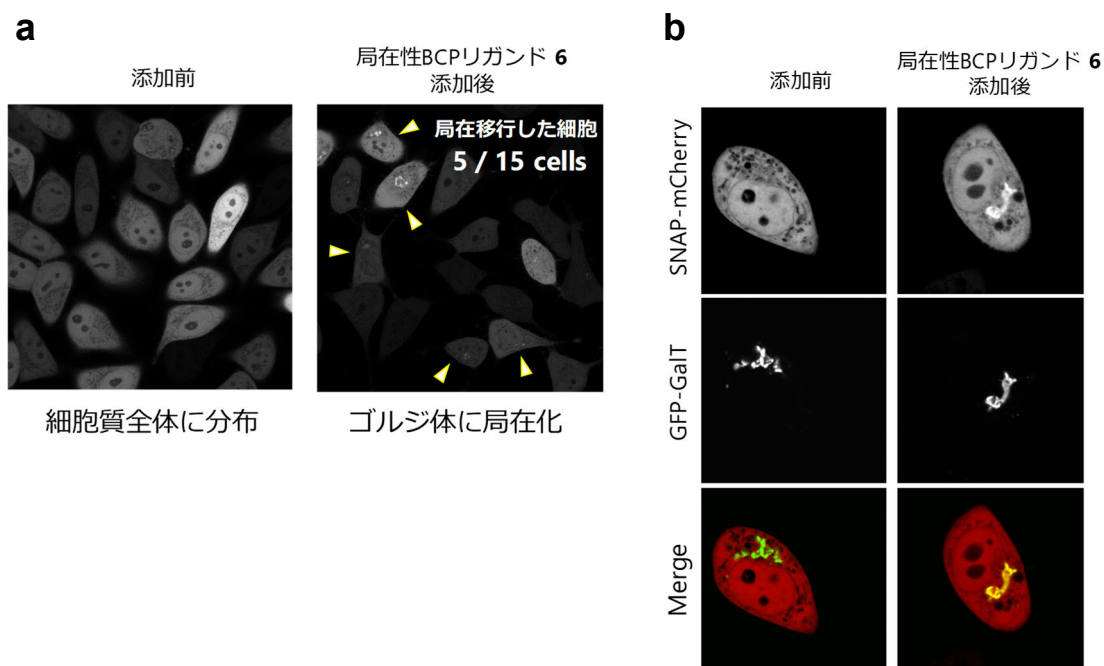


図 57 SNAP-GFP 発現 HeLa 細胞にリガンド化合物 **6** を添加した結果; (a) 低倍率観察, (b) 高倍率観察とゴルジ体マーカー (GalT: beta-1,4-galactosyltransferase) との共染色結果 (10 μ M **6**, 60 min incubation)

共焦点レーザー顕微鏡観察;

(a) Ex. 488 nm, Em. 500-600 nm, zoom: 1x;

(b) GFP channel: Ex. 488 nm, Em. 500-530 nm,

mCherry channel: Ex. 543 nm, Em. 555-655 nm, zoom: 5x

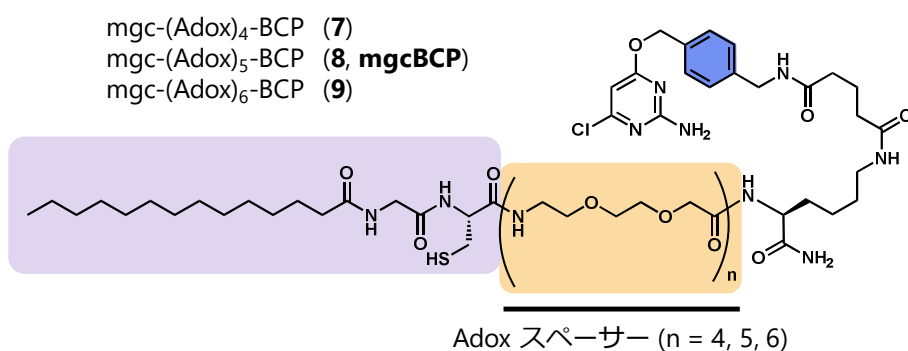


図 58 mgc-(Adox)_n-BCP リガンドの Adox スペーサー長の最適化;

mgc-(Adox)₄-BCP, **mgc-(Adox)₅-BCP**, **mgc-(Adox)₆-BCP** の分子構造

***mgcBCP** = mgc-(Adox)₅-BCP

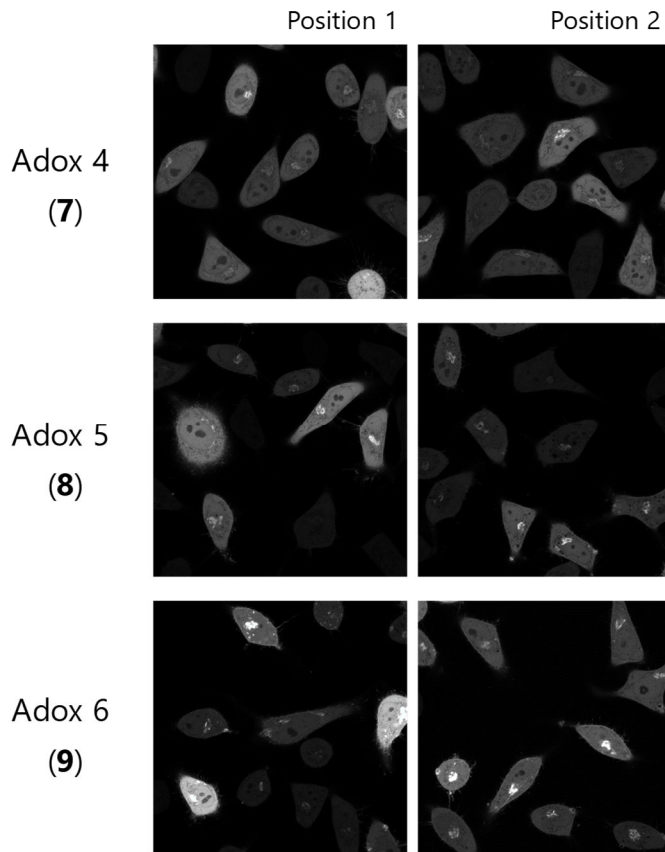


図 59 SNAP-GFP 発現 HeLa 細胞に局在性 BCP リガンド **7, 8, 9** をそれぞれ添加した結果 (10 μ M **7, 8, 9**, 60 min incubation) , 共焦点レーザー顕微鏡観察; Ex. 488 nm, Em. 500-600 nm, zoom = 1x

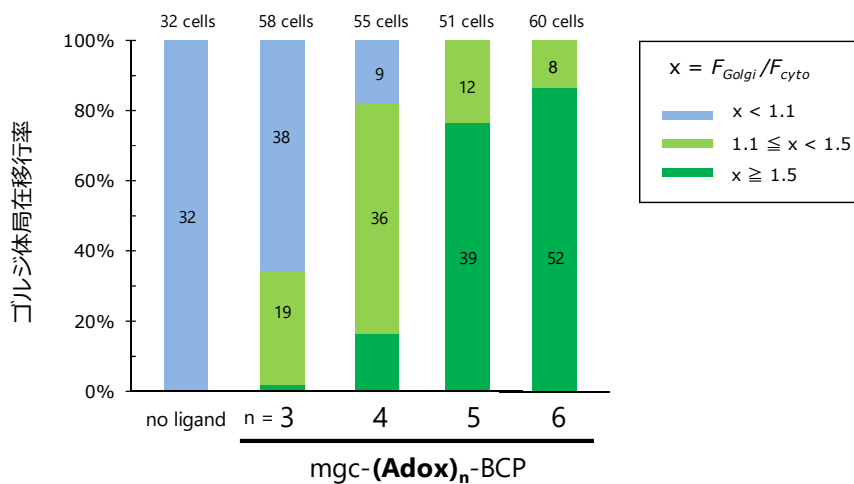


図 60 **mgc-(Adox)_n-BCP** リガンドを用いた SNAP-GFP のゴルジ体局在化の効率; ゴルジ体蛍光 F_{Golgi} と細胞質蛍光 F_{cyto} の強度比を導出し $F_{Golgi}/F_{cyto} \geq 1.1$ の条件を満たす細胞をゴルジ体局在化が起きた細胞としてカウントした (10 μ M **6, 7, 8, 9**, 60 min incubation)。

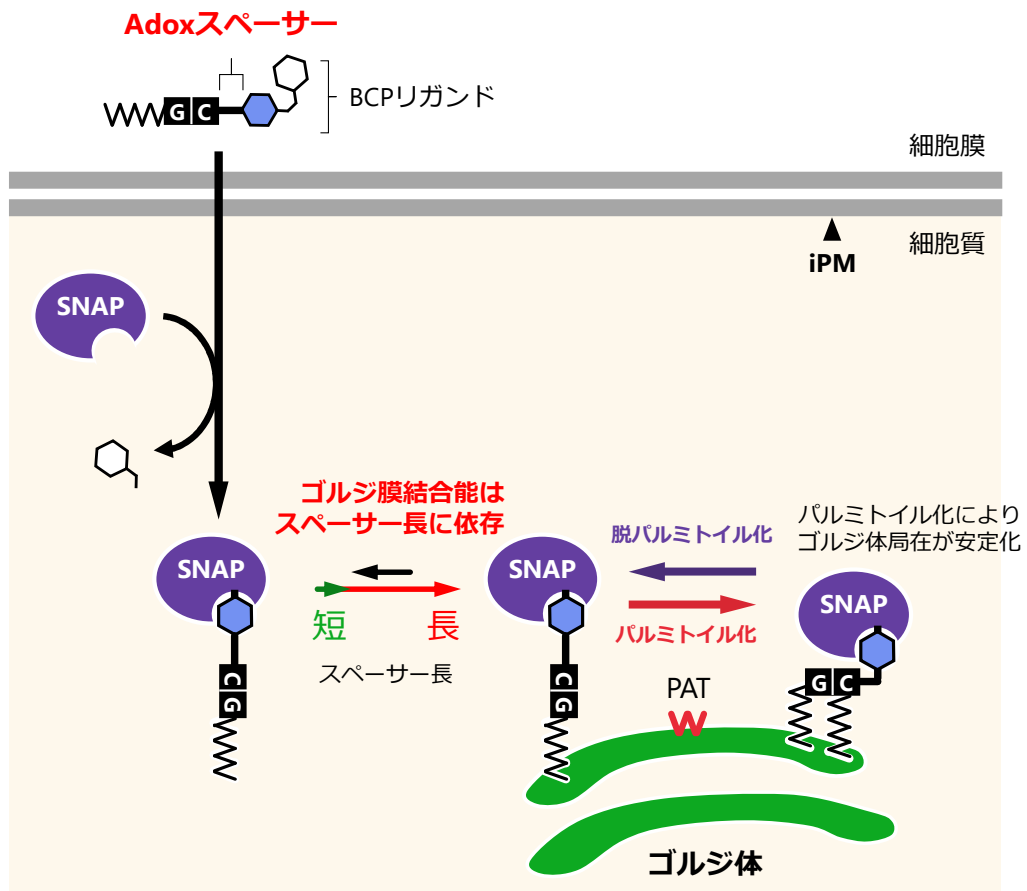
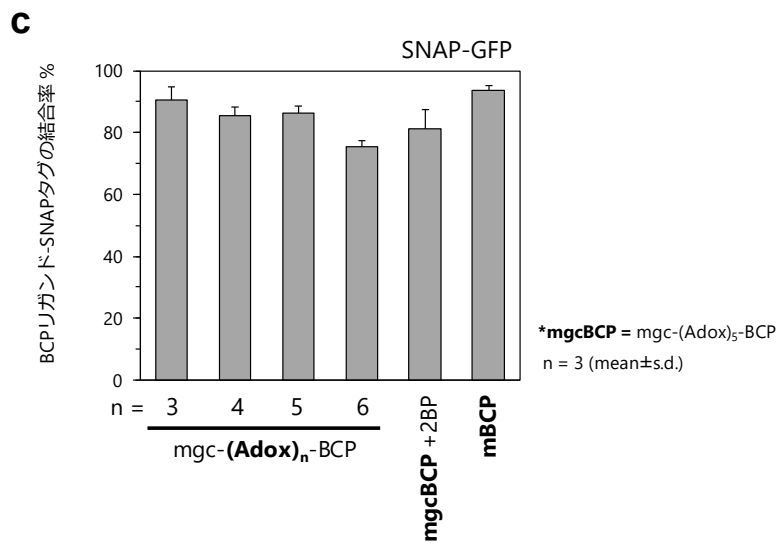
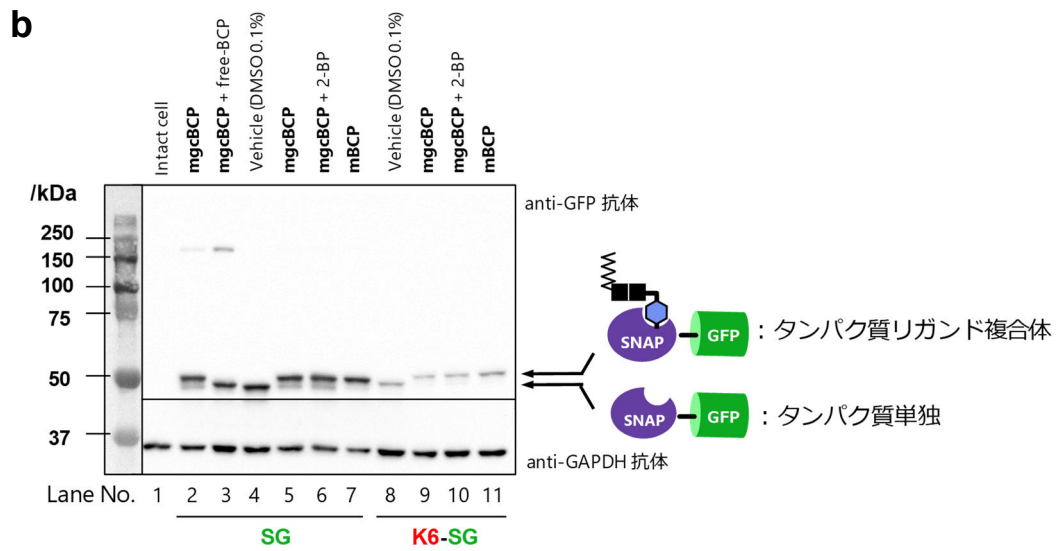
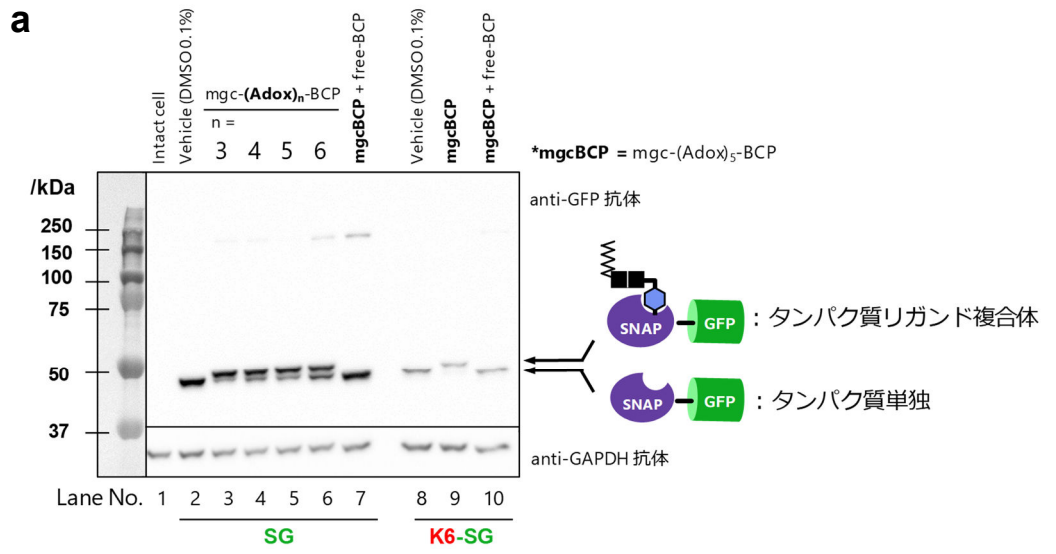


図 61 SNAP と mgcBCP の複合体のゴルジ体膜結合能と Adox スパーサー長の関係



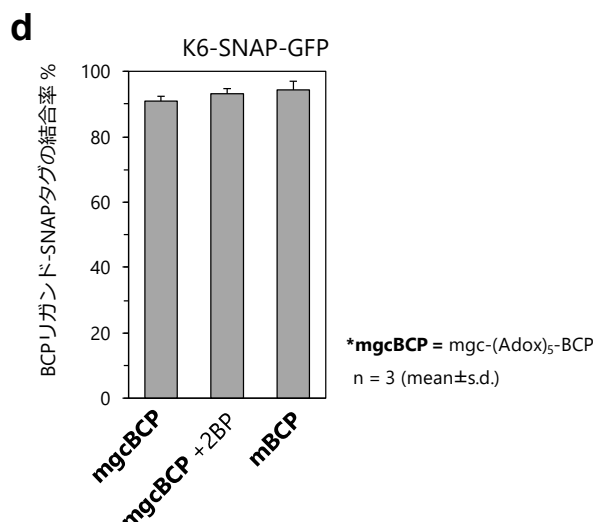


図 62 SNAP タグと局在性リガンド $\text{mgc}-(\text{Adox})_n\text{-BCP}$ の結合効率の評価;

(a) HeLa 細胞を用いた western blot 解析の結果, lane 1: intact cell, lane 2: SNAP-GFP 発現細胞に 0.1% DMSO (v/v)を添加 (60 min incubation), lane 3-6: SNAP-GFP 発現細胞に終濃度 10 μM で $\text{mgc}-(\text{Adox})_n\text{-BCP}$ ($n = 3, 4, 5, 6$)を添加 (60 min incubation), lane 7: SNAP-GFP 発現細胞に 10 μM BCP-COOH (40 min incubation) 添加した後に mgcBCP ($\text{mgc}-(\text{Adox})_5\text{-BCP}$)を添加 (60 min incubation), lane 8: K6-SNAP-GFP 発現細胞に 0.1% DMSO (v/v)を添加 (30 min incubation), lane 9: K6-SNAP-GFP 発現細胞に 10 μM mgcBCP を添加 (30 min incubation), lane 10: K6-SNAP-GFP 発現細胞に 10 μM BCP-COOH (40 min incubation)を添加した後に mgcBCP を添加 (30 min incubation);

(b) HeLa 細胞を用いた western blot 解析の結果, lane 1: intact cell, lane 2, 5: SNAP-GFP 発現細胞に 10 μM mgcBCP を添加 (60 min incubation), lane 3: SNAP-GFP 発現細胞に 10 μM BCP-COOH (40 min incubation) を添加した後に mgcBCP を添加 (60 min incubation), lane 4: SNAP-GFP 発現細胞に 0.1% DMSO (v/v)を添加 (60 min incubation), lane 6: 100 μM 2-BP を添加 (3.5 h incubation) した後に mgcBCP を添加 (60 min incubation), lane 7: SNAP-GFP 発現細胞に mBCP を添加 (60 min incubation), lane 8: K6-SNAP-GFP 発現細胞に 0.1% DMSO (v/v)を添加 (30 min incubation), lane 9: K6-SNAP-GFP 発現細胞に 10 μM mgcBCP を添加 (30 min incubation), lane 10: 100 μM 2-BP を添加 (6.0 h incubation) した後に mgcBCP を添加 (30 min incubation), lane 11: K6-SNAP-GFP 発現細胞に mBCP を添加 (30 min incubation)

(c) (a), (b)の SNAP-GFP と BCP リガンド結合率の定量解析結果 ($n = 3$, mean±s.d.);

(d) (a), (b)の K6-SNAP-GFP と BCP リガンドの結合率の定量解析結果 ($n = 3$, mean±s.d.);

*結合率 = (タンパク質リガンド複合体) / (タンパク質リガンド複合体+タンパク質単体)

4.3.3 mgcBCP を用いた SNAP タグの局在移行メカニズム

この **mgcBCP** と SNAP タグの結合は、free-BCP (図 63b) で予め処理することで阻害された (図 62 lane 7)。また、SNAP-GFP を発現した細胞を free-BCP で予め処理することで、**mgcBCP** を添加しても SNAP-GFP の局在移行が起こらないことを確認した (図 63d, f)。同様に、**mgcBCP** の BCP 部位を欠損した **mgcAc** を添加しても、SNAP-GFP の局在移行が起こらないことを確認した (図 63a, c, e)。これらの結果は、**mgcBCP** の BCP 部位と SNAP タグの特異的結合により SNAP-GFP の局在移行が起きていることを示している (図 63c, d)。

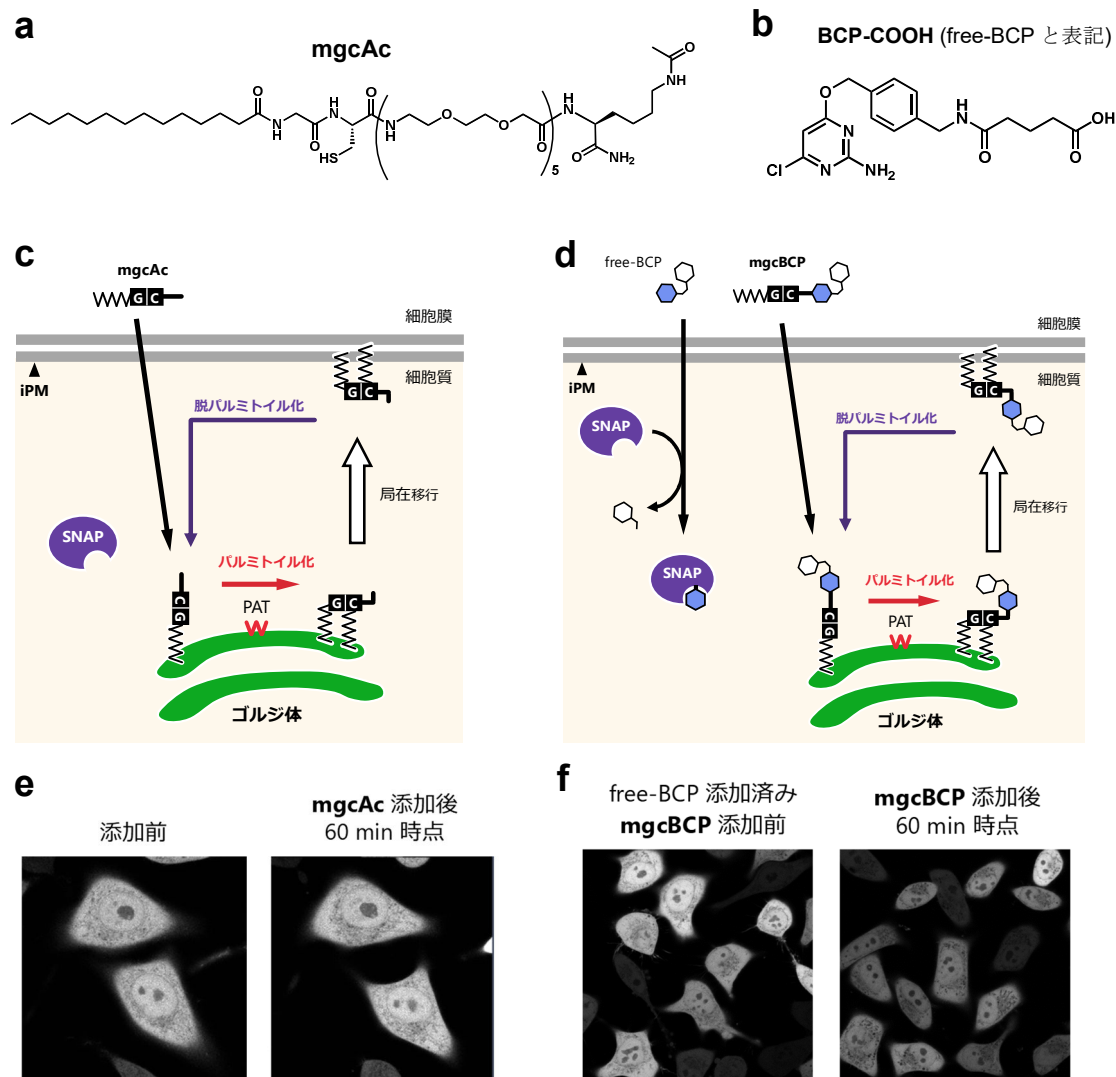


図 63 (a) **mgcAc** の分子構造, (b) **BCP-COOH** (free-BCP) の分子構造, (c) **mgcAc** を用いた際の SNAP タグの細胞内挙動, (d) free-BCP 添加後に **mgcBCP** を添加した際の SNAP タグの細胞内挙動, (e) SNAP-GFP 発現 HeLa 細胞に **mgcAc** (10 μ M, 60 min incubation)を添加した結果, (f) free-BCP (10 μ M, 40 min incubation)添加後に **mgcBCP** (10 μ M, 60 min incubation)を添加した結果

共焦点レーザー顕微鏡観察; Ex. 488 nm, Em. 500-600 nm, zoom = 2x (e), 1x (f)

4.3.4 SNAP タグの iPM 選択的局在移行誘導

4.3.3 項で示した通り、**mgcBCP** 添加により SNAP-GFP は iPM ではなくゴルジ体に局在化した。本項では、4.3.3 項で示した② **SNAP タグが iPM に局在化せずゴルジ体に局在化する問題**の解決に取り組んだ。**mgcBCP** は **mgcTMP** と同様に、パルミトイル化による脂質修飾を受けることで細胞膜内膜との親和性を高め、脱パルミトイル化により元に戻ると考えられる。実際に、パルミトイル化酵素である PAT を 2-bromopalmitate (2-BP) を用いて阻害すると、**mgcBCP** 添加後、SNAP-GFP のゴルジ体に局在化を示す細胞の割合が顕著に低下した (図 64a, c, e)。2-BP を用いた PAT 阻害は、**mgcBCP** と SNAP-GFP の結合を阻害しないことを確認した (図 62b 図 61 lane 6, 図 62c)。同様に、**mgcBCP** のパルミトイル化に必要となる Gly-Cys 部位を欠損させた **mBCP** を設計合成し、**mBCP** を用いた SNAP-GFP の局在移行誘導を試みた (図 64b, d)。その結果、SNAP-GFP のゴルジ体局在化を示す細胞の割合は、**mgcBCP** を用いた場合に比べ顕著に低下した (図 64f)。**mBCP** と SNAP-GFP の結合は、**mgcBCP** と同様に western blot により確認できた (図 62b lane 7, 図 62c)。これらの結果は、**mgcBCP**-SNAP タグ複合体 (**SNAP_{mgcBCP}**) が、パルミトイル化／脱パルミトイル化サイクルにより制御を受けることで、ゴルジ体に効率的に局在化していることを示している。しかし、同様の機構で制御されるはずの **mgcTMP** と eDHFR を用いた局在移行誘導では、iPM 局在化を示す (図 49)。したがって、**SNAP_{mgcBCP}** が iPM とゴルジ体のどちらに局在化するかは、別の決定因子が存在するものと考えられる。そこで筆者は、KRas4B や MARCKS (myristoylated alanine-rich C kinase substrate) といった iPM に分布するタンパク質の iPM 局在化が、脂質モチーフと複数のカチオン性アミノ酸を組み合わせたハイブリッドモチーフによって達成されていることに着目した^{[4-5e][4-7]}。KRas4B や MARCKS のカチオン性アミノ酸残基に由来する正電荷は、iPM に存在するアニオン性リン脂質と静電相互作用することでタンパク質全体の iPM 親和性・選択性を向上させ、ゴルジ体等への誤った局在化を防ぐことが知られている^[4-8]。そこで、SNAP タグにカチオンチャージを導入すれば、**SNAP_{mgcBCP}** の iPM 親和性が向上し、局在移行先がゴルジ体から iPM へ平衡が傾くものと考えた (図 65a)。SNAP タグの N 末端に、iPM のリン脂質と静電相互作用するカチオン性アミノ酸であるリジン (K) を 3 つ接続した K3-SNAP-GFP を設計し、細胞に発現させた (図 65b)。**mgcBCP** 添加前は、K3-SNAP-GFP は細胞全体を拡散するのみで局在性を示さなかった。ここに **mgcBCP** を添加すると、K3-SNAP-GFP はゴルジ体局在化する一方で、iPM にも局在化することが明らかとなった (図 65c)。この **SNAP_{mgcBCP}** の iPM 選択性を更に向上させるために、N 末端に連結するリジンの数を 6 つに増やした K6-SNAP-GFP を設計し、同様に細胞実験を行った (図 65b)。**mgcBCP** 添加前は、K6-SNAP-GFP は細胞全体を拡散した。ここに **mgcBCP** を添加すると、K6-SNAP-GFP が iPM 選択的かつ高効率に局在化することが明らかとなった (図 65c, d)。また、western blot の結果から K6 を付加した SNAP タグは **mgcBCP** と高効率に結合していることが明らかとなった (図 62a lane 9, 図 62d)。この **mgcBCP** と K6-SNAP タグの結合は、free-BCP で予め処理することで阻害された (図 62a lane 10)。また、K6-SNAP-GFP を発現した細胞を予め free-BCP で処理することで、**mgcBCP** を添加しても K6-SNAP-GFP の局在移行が起こらないことを確認した (図 66a)。

同様に、**mgcBCP** の BCP 部位を欠損した **mgcAc** を添加しても、K6-SNAP-GFP の局在移行が起これないことを確認した (図 66b)。これらの結果は、**mgcBCP** の BCP 部位と SNAP タグの特異的結合により K6-SNAP-GFP の局在移行が起きていることを示している。

以上より、SNAP タグへのリジン残基連結によるカチオンチャージの付与が、**mgcBCP** を用いた SNAP の局在移行誘導において、iPM 選択的を大きく向上させることが明らかとなった。

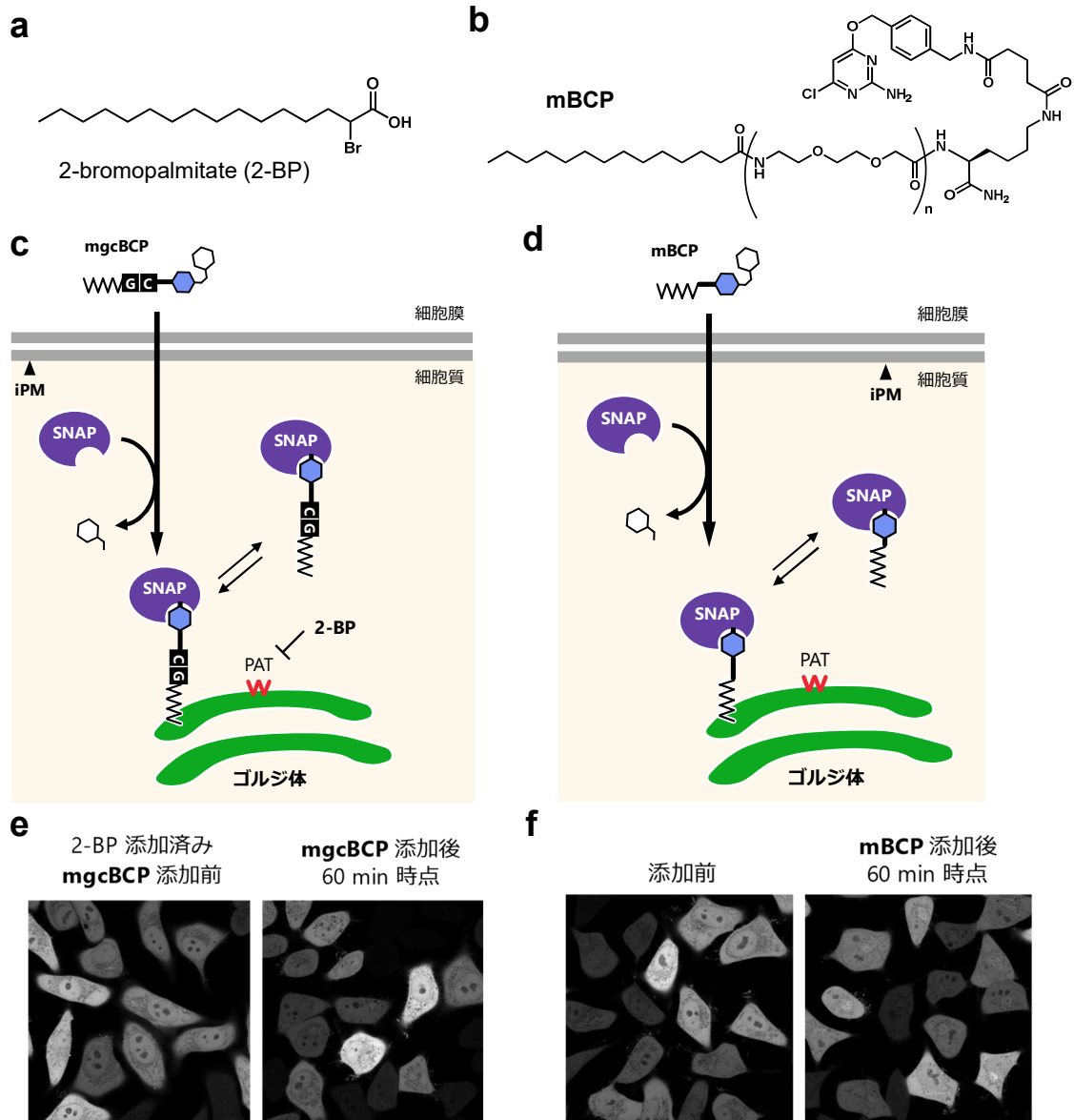


図 64 (a) 2-bromopalmitate (2-BP)の分子構造, (b) **mBCP** の分子構造, (c) 2-BP 添加後に **mgcBCP** を添加した際の SNAP タグの細胞内挙動, (d) **mBCP** を添加した際の SNAP タグの細胞内挙動, (e) 2-BP (100 μM, 3.5 h incubation)添加後に **mgcBCP** (10 μM, 60 min incubation)を添加した結果, (f) SNAP-GFP 発現 HeLa 細胞に **mBCP** (10 μM, 60 min incubation)を添加した結果 共焦点レーザー顕微鏡観察; Ex. 488 nm, Em. 500-600 nm, zoom = 2x (e), 1x (f)

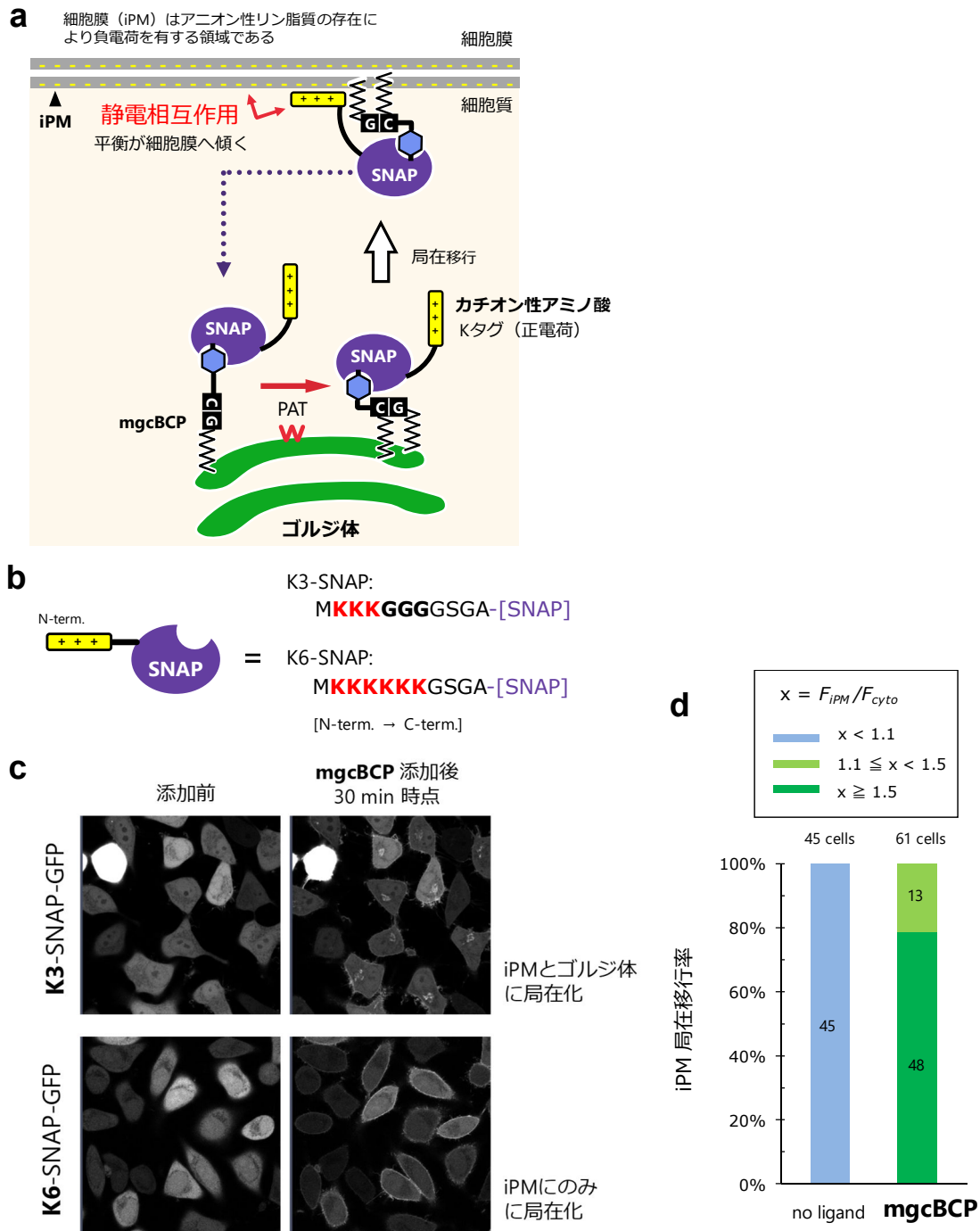


図 65 (a) カチオン性アミノ酸 (リジン) を導入した SNAP を用いた iPM 選択的局在移行の概略図, (b) リジン連結 SNAP (K3-SNAP, K6-SNAP) のアミノ酸配列, (c) K3-SNAP-GFP, K6-SNAP-GFP 発現 HeLa 細胞に **mgcBCP** (10 μ M, 30 min incubation) を添加した結果, (d) **mgcBCP** リガンドを用いた K6-SNAP-GFP の iPM 局在化の効率; iPM 蛍光 F_{iPM} と細胞質蛍光 F_{cyto} の強度比を導出し $F_{iPM}/F_{cyto} \geq 1.1$ の条件を満たす細胞を iPM 局在化が起きた細胞としてカウントした (10 μ M **mgcBCP**, 30 min)。

共焦点レーザー顕微鏡観察; Ex. 488 nm, Em. 500-600 nm, zoom = 1x

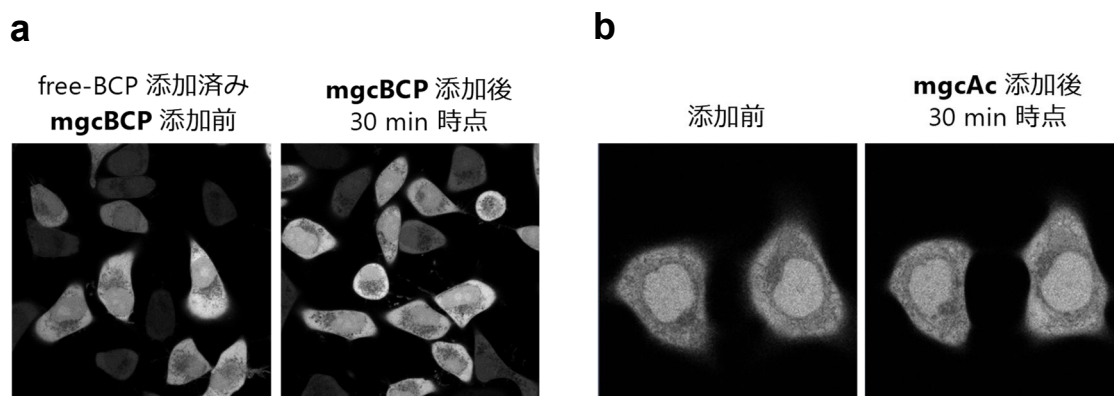


図 66 (a) free-BCP (10 μ M, 40 min incubation)添加後に **mgcBCP** (10 μ M, 30 min incubation)を添加した結果, (b) K6-SNAP-GFP 発現 HeLa 細胞に **mgcAc** (10 μ M, 30 min incubation)を添加した結果,

共焦点レーザー顕微鏡観察; Ex. 488 nm, Em. 500-600 nm, zoom = 1x (a), 2x (b)

4.3.5 mgcBCP を用いた K6-SNAP の iPM 局在化におけるパルミトイル化の必要性の評価

KRas4B や MARCKS は、1 本の脂質とカチオンチャージによって iPM に局在化する。一方で K6-SNAP と mgcBCP 複合体 (**K6-SNAP_{mgcBCP}**) は、2 本の脂質 (ミリストイル基とパルミトイル基) により iPM 局在化を達成している (図 65 図 65a)。そこで、**K6-SNAP_{mgcBCP}** の iPM 局在化において、2 本目の脂質修飾 (パルミトイル化) の必要性について検討した。まず、2-BP を用いて PAT を阻害した条件下で、mgcBCP による K6-SNAP-GFP の局在移行誘導を行った (図 67a)。その結果、K6-SNAP-GFP は iPM に局在化するもののゴルジ体局在化も見られるようになった (図 67c)。2-BP 処理した条件下で、mgcBCP と K6-SNAP-GFP が高効率に結合していることは、western blot により確認した (図 62b lane 10, 図 62d)。同様に、mgcBCP の Gly-Cys を欠損した mBCP を K6-SNAP-GFP の局在移行に用いた場合、K6-SNAP-GFP は iPM に局在化するものの、その移行誘導効率は低く、ゴルジ体にも局在化が見られた (図 67b, d)。mBCP と K6-SNAP-GFP が高効率に結合していることは、western blot により確認した (図 62 lane 11, 図 62d)。さらに、mgcBCP の Cys をアラニン (Ala) に置換した mgaBCP を設計合成し、mgaBCP を用いて K6-SNAP-GFP の局在移行誘導を行った (図 68a, b)。その結果、mgaBCP の添加により K6-SNAP-GFP は iPM 局在化したものの、K6-SNAP-GFP は iPM の局所領域に集積し、mgcBCP 使用時とは異なる局在化パターンを示した (図 68c)。また、mgcBCP の Cys をセリン (Ser) に置換した mgsTMP を使用した際の結果は、mgaBCP 使用時の結果と一致した (図 69a, b)。以上の結果より、**K6-SNAP_{mgcBCP}** の iPM 局在化におけるパルミトイル化は、iPM 局在化効率や iPM 選択性の向上、さらに iPM 局在化した **K6-SNAP_{mgcBCP}** の分布の均一化に関与する重要な機構であることが明らかとなった。

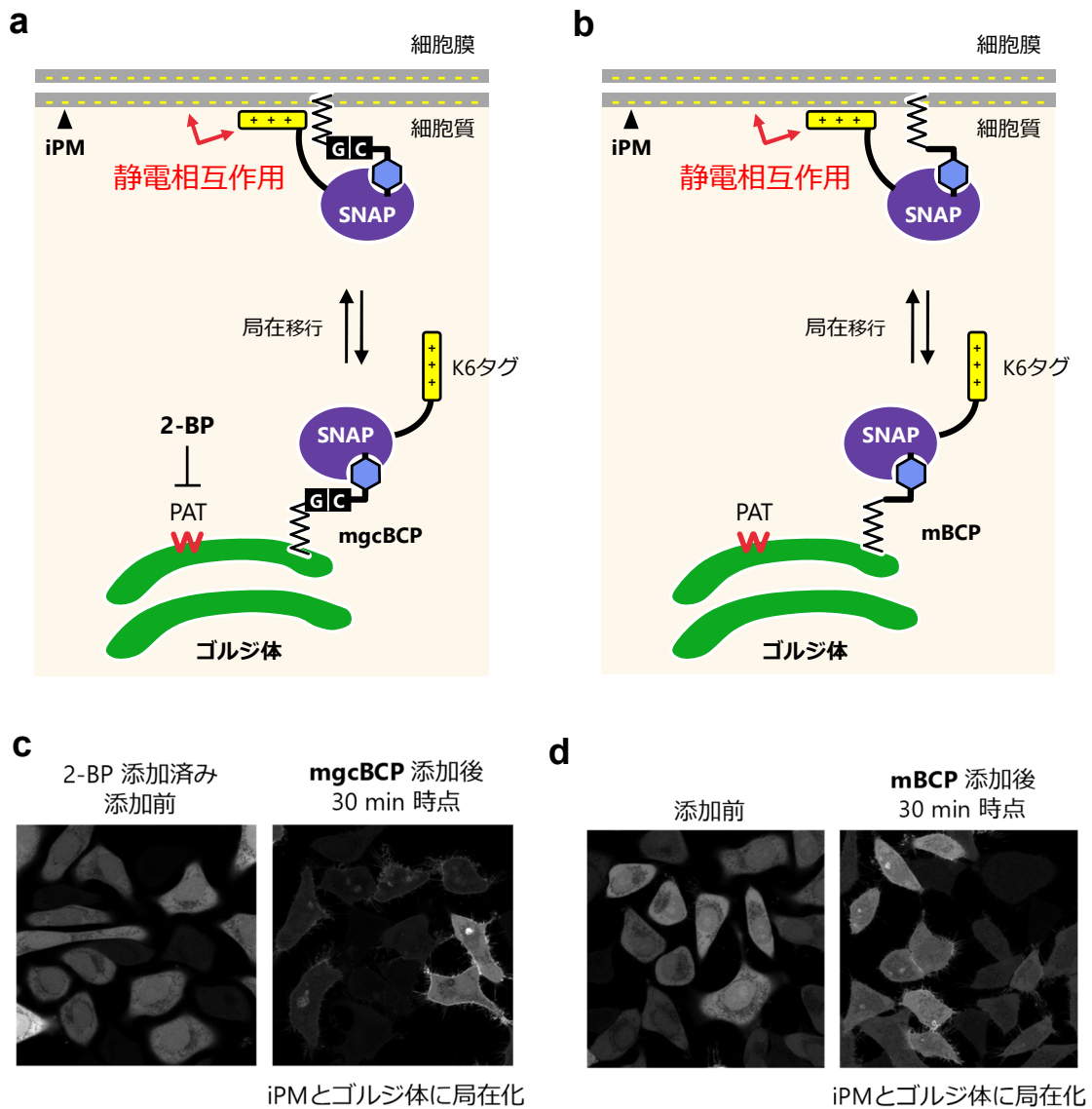


図 67 (a) 2-BP 阻害時に **mgcBCP** を用いた K6-SNAP の局在移行誘導時の細胞内挙動の概略図, (b) **mBCP** を用いた K6-SNAP の局在移行誘導時の細胞内挙動の概略図, (c) K6-SNAP-GFP 発現 HeLa 細胞に 2-BP (100 μ M 2-BP, 6.0 h incubation) を添加した後に **mgcBCP** (10 μ M, 30 min incubation) を添加した結果, (d) K6-SNAP-GFP 発現 HeLa 細胞に **mBCP** (10 μ M, 30 min incubation) を添加した結果, 共焦点レーザー顕微鏡観察; Ex. 488 nm, Em. 500-600 nm, zoom = 1x

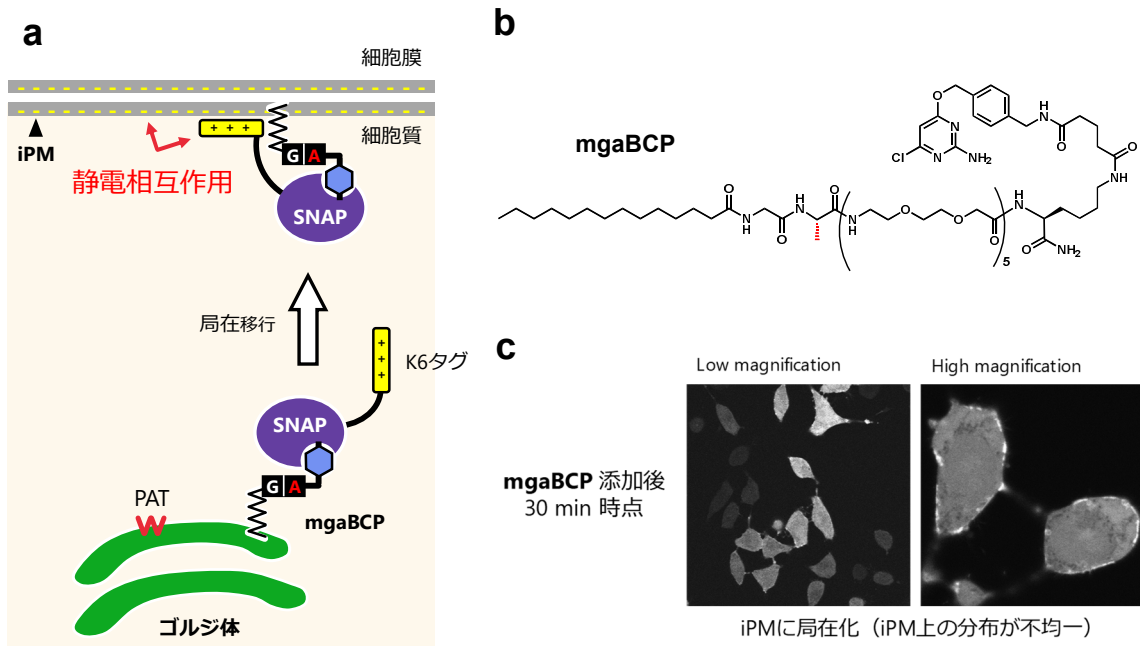


図 68 (a) **mgaBCP** を用いた K6-SNAP の局在移行誘導時の細胞内挙動の概略図, (b) **mgaBCP** の分子構造, (c) K6-SNAP-GFP 発現 HeLa 細胞に **mgaBCP** (10 μ M, 30 min incubation) を添加した結果, 共焦点レーザー顕微鏡観察; Ex. 488 nm, Em. 500-600 nm, zoom = 1x (Low magnification), 4x (High magnification)

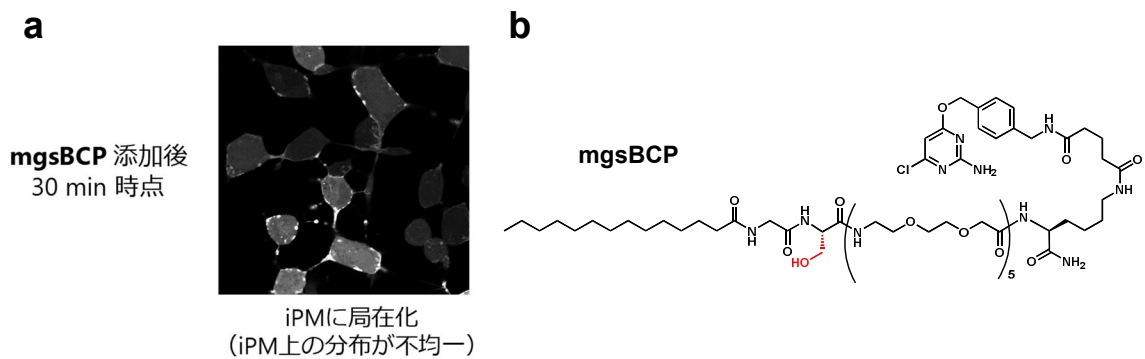
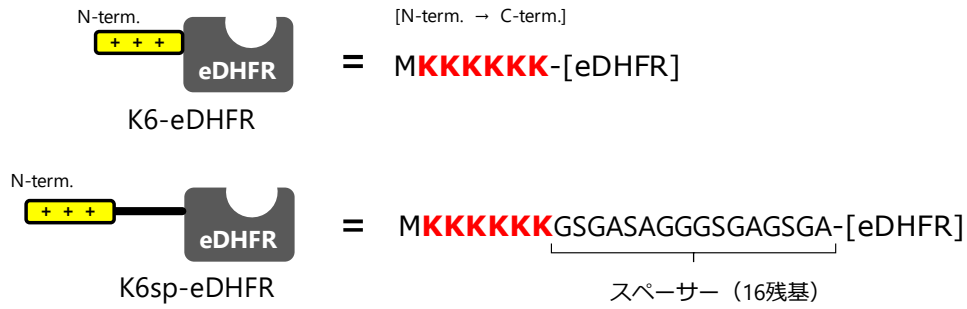


図 69 (a) K6-SNAP-GFP 発現 HeLa 細胞に **mgsBCP** (10 μ M, 30 min incubation) を添加した結果, (b) **mgsBCP** の分子構造
共焦点レーザー顕微鏡観察; Ex. 488 nm, Em. 500-600 nm, zoom = 1x

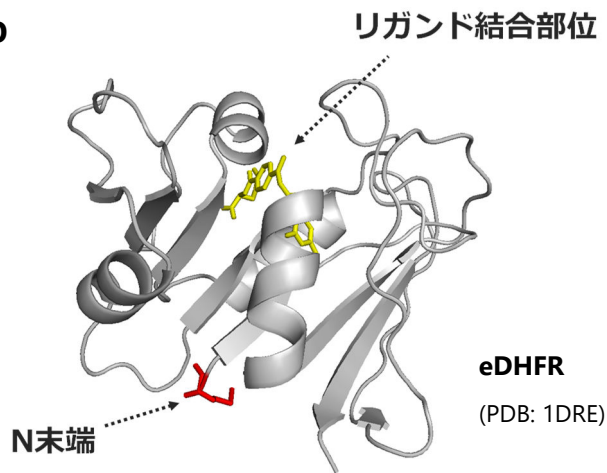
4.3.6 リジン付加による eDHFR の iPM 選択的局在移行誘導

4.3.1 項で示した **mgcTMP** を用いた eDHFR の iPM 局在移行誘導では、iPM だけでなくゴルジ体への局在化する。4.3.4 項に示したように、K3-SNAP が iPM／ゴルジ体に同時に局在化するが、SNAP に連結するリジンの数を 6 つに増やした K6-SNAP は iPM 選択的に局在化する (図 65)。そこで同様に、eDHFR の N 末端にリジン残基を付加すれば iPM 選択的な局在移行誘導が達成できるものと考えられる。そこで、eDHFR の N 末端に直接リジン残基を 6 つ付加したタンパク質 K6-eDHFR を設計し、細胞に発現させた (図 70a)。**mgcTMP** 添加前は、K6-eDHFR は細胞全体を拡散し局在性を示さないことを確認した。ここに **mgcTMP** を添加すると、K6-eDHFR は iPM に局在移行したが、依然としてゴルジ体にも局在化した (図 70d)。この原因として eDHFR の N 末端が TMP リガンド結合部位のほぼ裏側に位置しているため、K6 タグが iPM 上のアニオン性リン脂質に到達できず、静電相互作用できないためと考えられる (図 70b, c)。したがって、K6 タグと iPM のアニオン性脂質との効率的に静電相互作用を達成するために、eDHFR と K6 タグの間に (eDHFR の N 末端からリガンド結合ポケット近傍に隣接する iPM に到達可能な) 十分長いスペーサーが必要であると考えられる (図 70e)。そこで、eDHFR の N 末端に 16 残基のスペーサー配列を挿入し、その先に K6 タグを導入した K6sp-eDHFR を設計した (図 70a)。**mgcTMP** 添加前は、K6sp-eDHFR は細胞全体を拡散し局在性を示さないことを確認した。ここに **mgcTMP** を添加した結果、K6sp-eDHFR は iPM にのみ局在化した (図 70f)。本結果より、K6 タグを用いた eDHFR を用いた iPM 選択的な局在移行誘導システムの開発に成功した。さらに本結果は、リジンタグの付加が、タンパク質の iPM 選択性を向上させるための汎用的なアプローチとなることを示している。

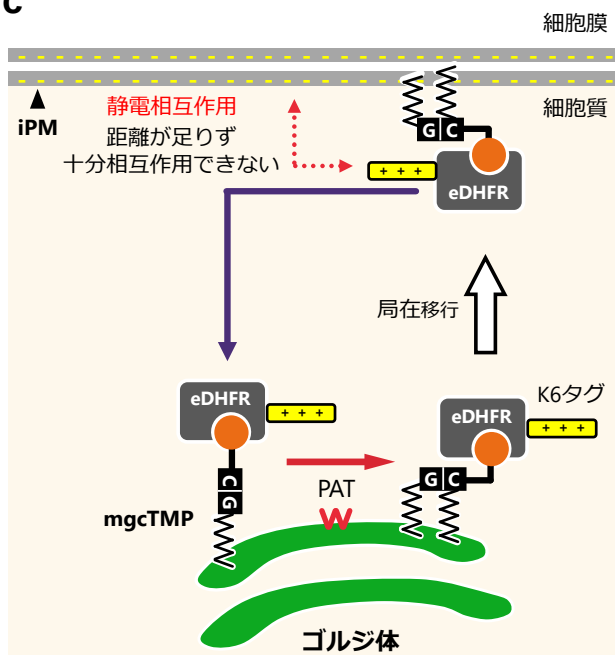
a



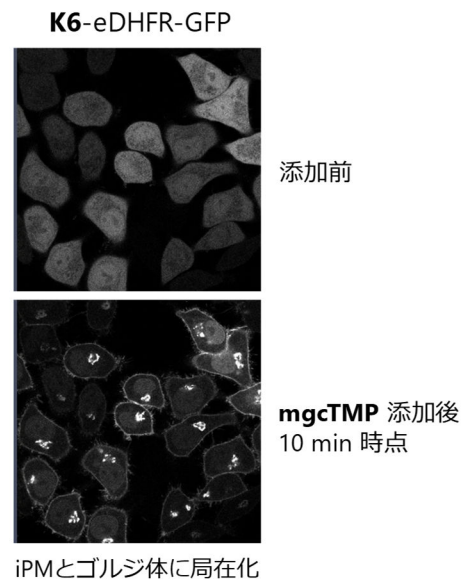
b



c



d



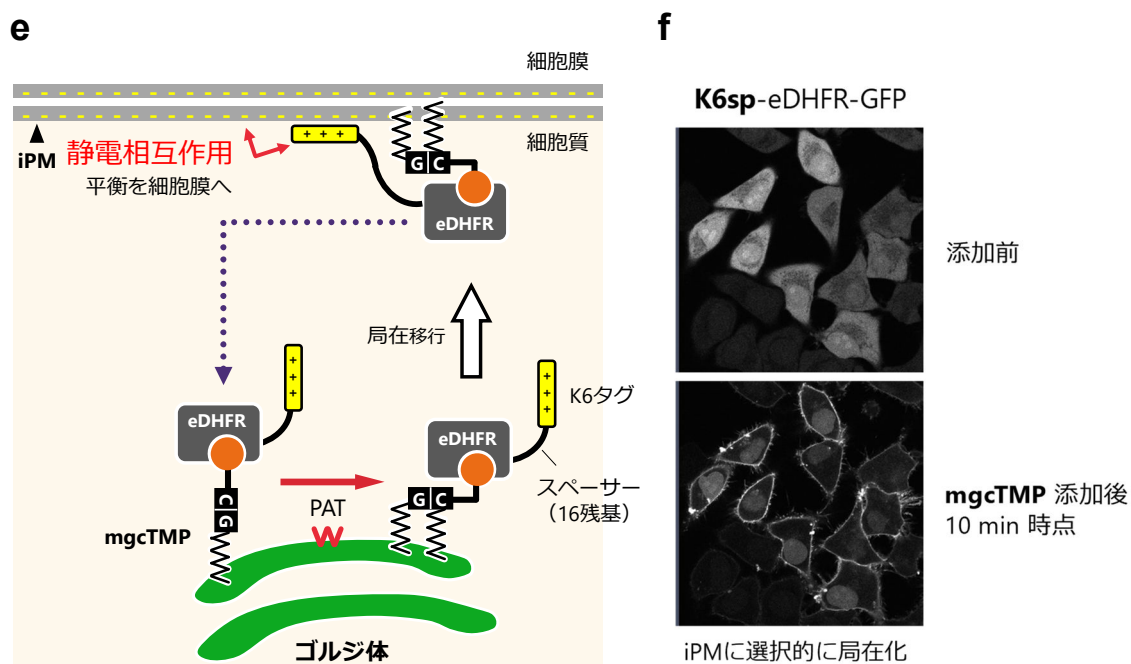


図 70 (a) K6 タグ連結 eDHFR (K6-eDHFR, K6sp-eDHFR) のアミノ酸配列, (b) eDHFR の N 末端とリガンド結合部位の位置関係 (PDB: 1DRE), (c) K6-eDHFR が iPM だけでなくゴルジ体にも局在化する理由の考察, (d) K6-eDHFR-GFP 発現 HeLa 細胞に **mgcTMP** (10 μ M, 10 min incubation)を添加した結果, (e) スペーサーを導入した K6sp-eDHFR を用いた iPM 選択的局在化のメカニズムの概略図, (f) K6sp-eDHFR-GFP 発現 HeLa 細胞に **mgcTMP** (10 μ M, 10 min incubation)を添加した結果
共焦点レーザー顕微鏡観察; Ex. 488 nm, Em. 500-600 nm, zoom = 1x

4.3.7 SNAP システムと eDHFR システムの局在移行誘導速度の解析

mgcBCP や **mgcTMP** を用いたタンパク質の局在移行速度は、実際に細胞内シグナル制御ツールとして使用する上で重要なパラメータとなる。終濃度 $10\ \mu\text{M}$ で **mgcTMP** を添加した際の eDHFR の iPM 局在化は、10 min 程度で飽和する^[2-9]。本項では、本研究で新たに開発した局在移行誘導システムの局在移行速度をイメージングをベースに解析した。評価の際は、**mgcBCP**, **mgcTMP** の終濃度を $10\ \mu\text{M}$ とし、(a) **mgcBCP** を用いた SNAP-GFP のゴルジ体局在化、(b) **mgcBCP** を用いた K6-SNAP-GFP の iPM 局在化、(c) **mgcTMP** を用いた K6sp-eDHFR-GFP の iPM 局在化の移行速度をそれぞれ解析した。解析結果は、図 71 に示した。(a) SNAP-GFP のゴルジ体局在化は、**mgcBCP** 添加後 40 min で飽和した。(b) K6-SNAP-GFP の iPM 局在化は、**mgcBCP** 添加後 15 min で飽和した。(c) K6sp-eDHFR-GFP の iPM 局在化は、**mgcTMP** 添加後 10 min で飽和した。

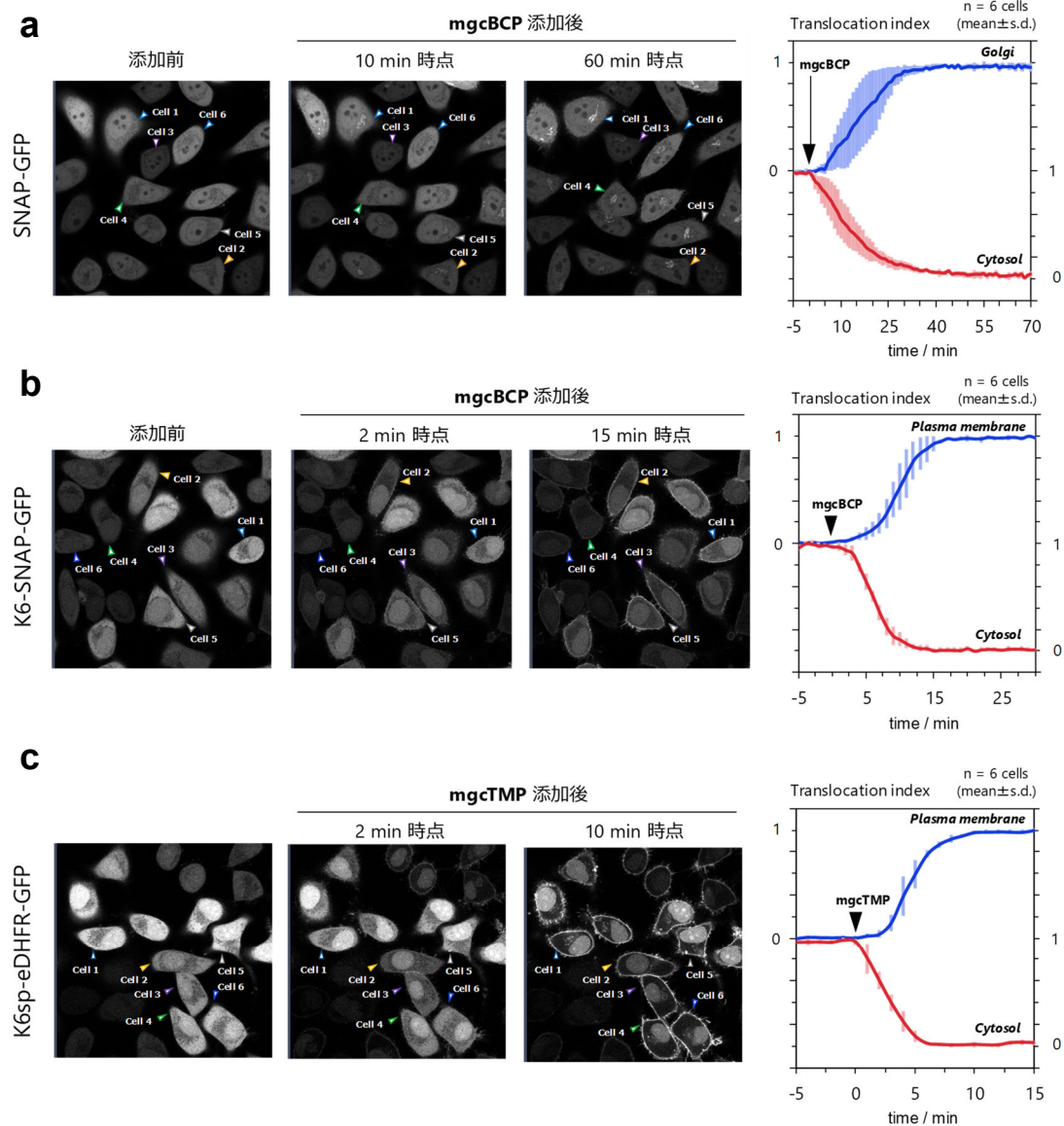


図 71 (a) SNAP-GFP 発現 HeLa 細胞: **mgcBCP** (10 μ M)添加時のゴルジ体局在化のタイムラプスイメージング (1 frame/1 min) 結果と局在移行速度の定量解析結果, (b) K6-SNAP-GFP 発現 HeLa 細胞: **mgcBCP** (10 μ M)添加時の iPM 体局在化のタイムラプスイメージング (1 frame/1 min) 結果と局在移行速度の定量解析結果, (c) K6sp-eDHFR-GFP 発現 HeLa 細胞: **mgcTMP** (10 μ M)添加時の iPM 体局在化のタイムラプスイメージング (1 frame/1 min) 結果と局在移行速度の定量解析結果
共焦点レーザー顕微鏡観察; Ex. 488 nm, Em. 500-600 nm, zoom = 1x

4.3.8 SNAP システムの iPM 局在化の持続時間

K6-SNAP-GFP を恒常発現させた HeLa 細胞を用意し、**mgcBCP** を用いた iPM 局在移行誘導を行った。その後 (0.5 h 以降では) 血清含有培地で培養を続け、K6-SNAP-GFP の iPM 局在化がどれ位持続するかを評価した。**mgcBCP** 添加後 0.5 h から、6 h, 12 h, 24 h における細胞膜蛍光 (F_{mem}) に対する細胞質蛍光 (F_{cyto}) の強度比 ($F_{\text{mem}}/F_{\text{cyto}}$) を導出することで、K6-SNAP-GFP の iPM 局在化の持続時間を評価した (図 72)。解析の結果、**mgcBCP** 添加後 30 min 時点ですべての細胞が $F_{\text{mem}}/F_{\text{cyto}} \geq 1.5$ であり、イメージング結果からも F_{mem} が高く F_{cyto} が低いことが明らかであった (図 72a, c)。時間の経過とともに、タンパク質のターンオーバーにより徐々に細胞質の GFP 蛍光が明るくなり、 $F_{\text{mem}}/F_{\text{cyto}} \geq 1.5$ の条件を満たす細胞数が徐々に減少した (図 72b, c)。一方で、cross-section 解析を行うと、K6-SNAP-GFP の iPM 局在化は、24 h 時点においてもほぼ全ての細胞で確認できた (図 72a, b)。以上の結果より、**mgcBCP** を用いた K6-SNAP-GFP の iPM 局在化は、少なくとも 24 h は持続することが明らかとなった。

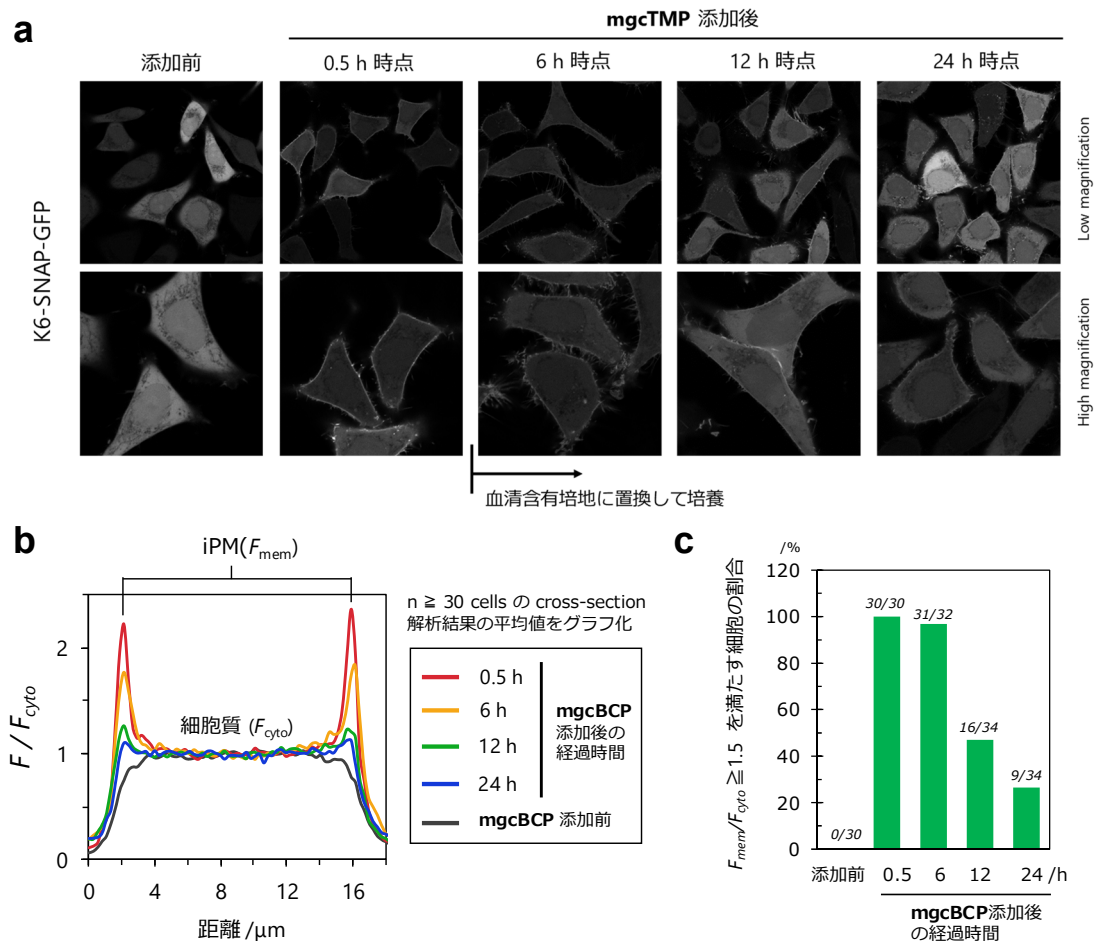


図 72 **mgcBCP** を用いた K6-SNAP-GFP の iPM 局在化の持続時間の評価, (a) K6-SNAP-GFP 発現 HeLa 細胞: **mgcBCP** (10 μM) 添加後の各時間におけるイメージング結果, (b) 各時間における cross-section 解析結果, (c) $F_{\text{mem}}/F_{\text{cyto}} \geq 1.5$ を満たす細胞の経時変化
共焦点レーザー顕微鏡観察; Ex. 488 nm, Em. 500-600 nm, zoom = 1x, 4x

4.3.9 タンパク質の iPM 局在移行誘導に基づくシグナル伝達経路の人工活性化

本項では、4.3.4 項で確立した **mgcBCP** と K6-SNAP を用いた iPM 選択的タンパク質局在移行誘導システムを用いることで、細胞質から iPM へのタンパク質局在移行誘導に基づく、細胞内シグナル伝達経路の人工活性化を試みた。4.3.1 項と同様に標的シグナルとして Ras/ERK 経路を選択した。まず、K6-SNAP-GFP に RasGEF として知られる RasGRF1 の触媒ドメイン (RasGRF1(Cdc25))^[4-6c] を連結した K6-SNAP-GFP-RasGRF1(Cdc25)を設計し HeLa 細胞に発現させた。Ras/ERK 経路の活性化は、ERK の活性化に応答して核内から核外へ移行する ERK-KTR プローブに、赤色蛍光タンパク質の mCherry を連結した ERK-KTR(mCherry)を共発現することでモニターした (図 73) ^[4-9]。各タンパク質の細胞内局在は、共焦点レーザー顕微鏡を用いた生細胞イメージングにより確認した (図 74b)。**mgcBCP** 添加前は、K6-SNAP-GFP-RasGRF1(Cdc25)は細胞全体を拡散し、ERK-KTR(mCherry)は核内に集積した。この結果は、K6-SNAP-GFP-RasGRF1(Cdc25)を細胞に発現させただけでは、Ras/ERK 経路はオフ状態であることを示している。ここに **mgcBCP** を添加すると、K6-SNAP-GFP-RasGRF1(Cdc25)は、15 min 程度で iPM 選択的に局在移行し、ERK-KTR(mCherry)の核外移行は 15 min に開始し 30 min で飽和した (図 74a, b)。この ERK-KTR(mCherry)の核外移行は、MEK 阻害剤 (PD98059) により阻害された (図 74a, b)。また、RasGRF1(Cdc25)を欠損した K6-SNAP-GFP の iPM 局在化を **mgcBCP** を用いて誘導しても、ERK-KTR(mCherry)の核外移行は起こらないことを確認した (図 74a, b)。これらの結果は、RasGEF→Ras→Raf→MEK→ERK のカスケードが、**mgcBCP** を用いた K6-SNAP 融合 RasGEF の iPM 局在移行誘導により活性化できることを示している (図 73)。

同様に、K6sp-eDHFR に Akt 経路の活性化因子である PI3K (phosphoinositide 3-kinase) の iSH ドメインを連結した K6sp-eDHFR 融合 iSH を用いた、PI3K/Akt 経路の選択的活性化を試みた。PI3K は、イノシトールリン脂質のイノシトール環 3 位のヒドロキシ基のリン酸化を行うキナーゼであり、p85 と p110 のヘテロ二量体である。iSH ドメインは p85 に由来し、p110 結合モチーフとして知られている^[4-10]。PI3K のキナーゼ活性は、触媒サブユニットである p110 に由来する。iSH は、p110 と複合体を形成し、iSH が iPM に局在化すると p110 も同時に iPM 局在化する。iPM 局在化した p110 は iPM 上に存在する PI(4,5)P₂ (phosphatidyl-inositol 4,5-bisphosphate, 以降 PIP2 と表記)を PI(3,4,5)P₃ (以降 PIP3 と表記)に変換し、下流の Akt を活性化する^[4-10b]。したがって、**mgcTMP** 添加により K6sp-eDHFR-GFP-iSH の iPM 局在化を誘導することで PI3K/Akt 経路が活性化するものと考えられる (図 75)。そこで、K6sp-eDHFR-GFP-iSH を発現させた HeLa 細胞を用意した。PI3K/Akt 経路の活性化は、Akt の活性化に応答して核内から核外へ移行する Akt-KTR プローブに、シアン色蛍光タンパク質の nTurquoise2 を連結した AKT-KTR(nTurquoise2)を共発現することでモニターした^[4-11]。**mgcTMP** 添加前は、K6sp-eDHFR-GFP-iSH は細胞全体を拡散し、AKT-KTR(nTurquoise2)は核内に集積した。この結果は、**mgcTMP** 添加前では PI3K/Akt 経路がオフ状態であることを示している。ここに **mgcTMP** を添加すると、K6sp-eDHFR-GFP-iSH は、3 min 程度で iPM 選択的に局在移行し、AKT-KTR(nTurquoise2)の核外移行は 3 min に開始し 25 min で飽和した (図 76a, b)。この AKT-KTR(nTurquoise2)の核外移行は、Akt 阻害剤 (AZD5363)

により阻害された(図 76a, b)。また、iSH を欠損した K6sp-eDHFR-GFP の iPM 局在化を **mgcTMP** を用いて誘導しても、AKT-KTR(nTurquoise2)の核外移行が起こらないことを確認した (図 76a, b)。これらの結果は、PI3K→PIP3→Akt カスケードが、**mgcTMP** を用いた K6sp-eDHFR 融合 iSH の iPM 局在移行により活性化できることを示している。

以上の結果より、K6-SNAP、K6sp-eDHFR を用いることで、iPM 選択的なタンパク質の局在移行誘導に基づく、Ras/ERK 経路と PI3K/Akt 経路の人工活性化システムを生細胞内に構築することに成功した。

SNAP system: Ras/ERK activation

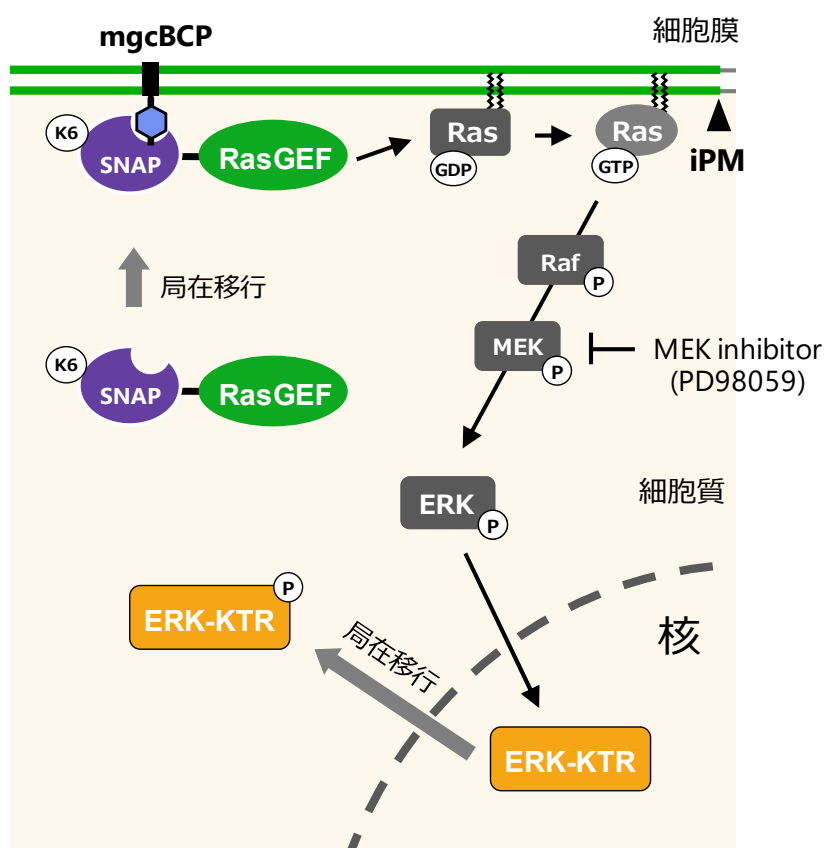


図 73 K6-SNAP 融合 RasGEF (RasGRF1(Cdc25)) の iPM 局在移行誘導による Ras/ERK 経路の人工活性化の概略図

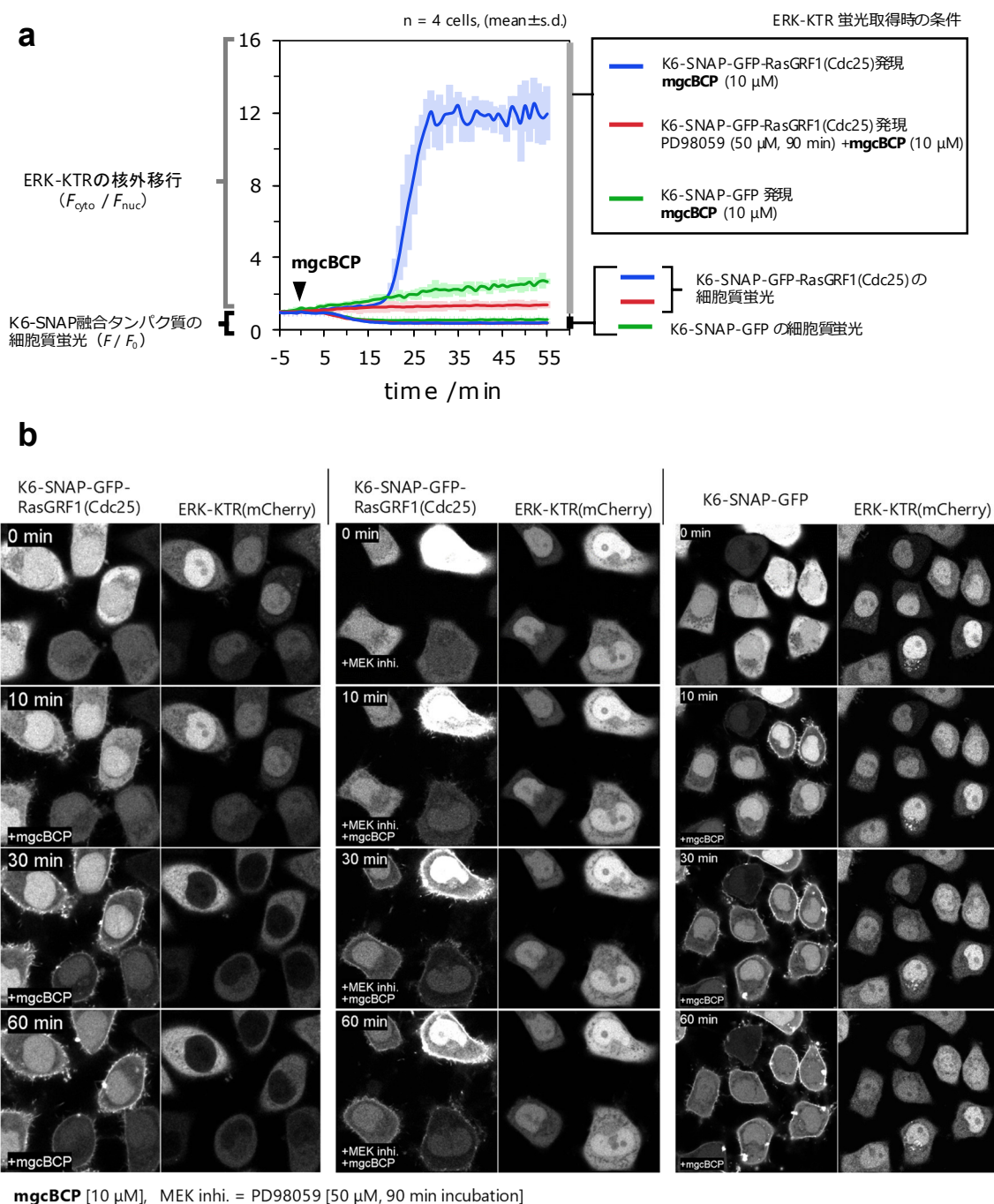


図 74 **mgcBCP** を用いた K6-SNAP-GFP-RasGRF1(Cdc25)の iPM 局在化による Ras/ERK 経路の人工活性化, (a) **mgcBCP** を用いた K6-SNAP 融合タンパク質の iPM 局在化と ERK-KTR(mCherry)の核外移行の定量解析結果 ($n = 4$, mean \pm s.d.), (b) (a)の解析に用いたタイムラプスイメージングデータ, 共焦点レーザー顕微鏡観察; GFP channel: Ex. 488 nm, Em. 493-574 nm, mCherry channel: Ex. 543 nm, Em. 578-696 nm, zoom = 1.5x

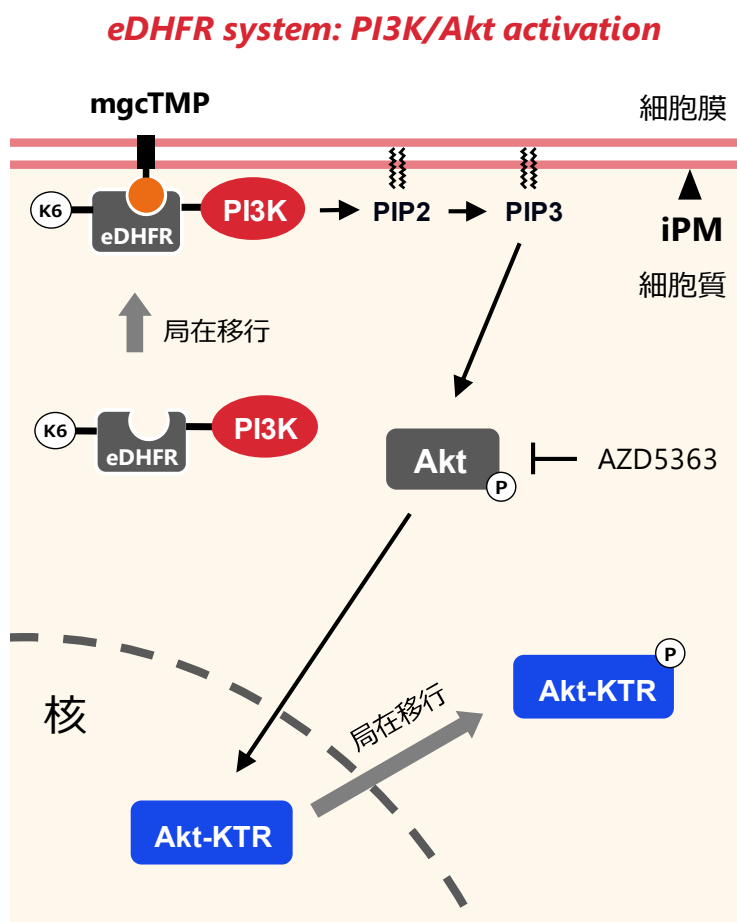


図 75 K6sp-eDHFR 融合 PI3KiSH ドメイン (iSH) の iPM 局在移行誘導による PI3K/Akt 経路の人工活性化の概略図

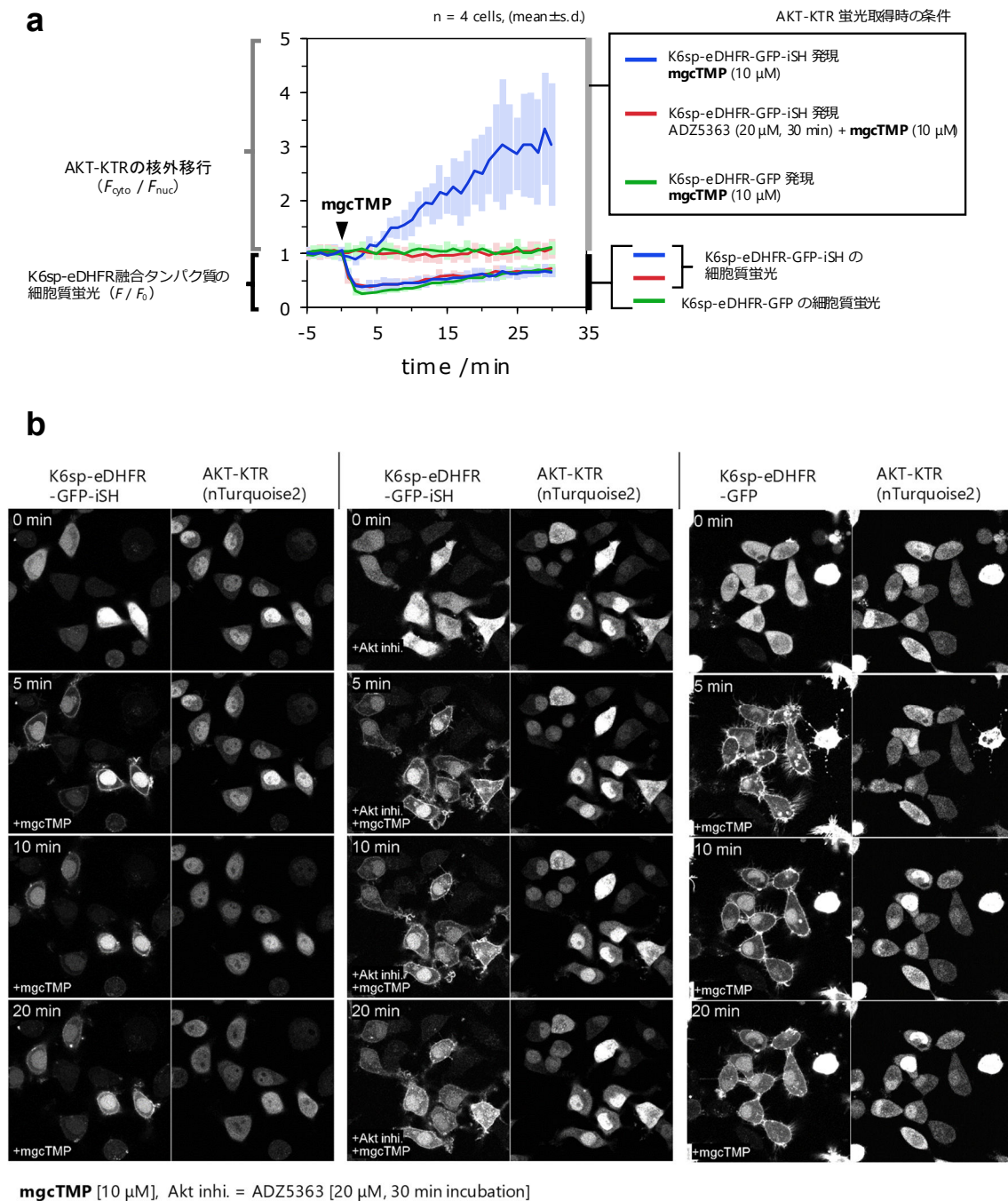


図 76 **mgcBCP** を用いた K6-SNAP-GFP-RasGRF1(Cdc25)の iPM 局在化による Ras/ERK 経路の人工活性化, (a) **mgcBCP** を用いた K6-SNAP 融合タンパク質の iPM 局在化と ERK-KTR(mCherry)の核外移行の定量解析結果 (n = 4, mean ± s.d.) , (b) (a)の解析に用いたタイムラプスイメージングデータ, 共焦点レーザー顕微鏡観察; nTurquoise2 channel: Ex. 456 nm, Em. 463-493 nm, GFP channel: Ex. 488 nm, Em. 495-600 nm, zoom = 1.0x

4.3.10 SNAP システムと eDHFR システムの併用による 2 種類のシグナル伝達経路の独立制御

本研究では、K6-SNAP システムと K6sp-eDHFR システムを用いて、2 種類のタンパク質の iPM 局在移行の独立制御技術の確立を目指す。この目的を達成するためには、SNAP システムと eDHFR システム間の直交性の確保が必要不可欠である。

本項では、まず K6-SNAP-mCherry と K6sp-eDHFR-GFP を共発現させた HeLa 細胞において、K6-SNAP と K6sp-eDHFR の iPM 局在移行誘導を独立に制御できるかどうかをイメージングにより調べ、2 つのシステムの直交性を評価した (図 77)。リガンド化合物添加前は、K6-SNAP-mCherry と K6sp-eDHFR-GFP は、いずれも細胞全体を拡散した。ここにまず、**mgcBCP** を添加すると K6-SNAP-mCherry の iPM 局在化が誘導され、K6sp-eDHFR-GFP は細胞全体を拡散したままであった (図 78)。続けて、**mgcTMP** を添加すると K6sp-eDHFR-GFP が iPM へ局在移行した (図 78)。これらの結果より、K6-SNAP システムと K6sp-eDHFR システムは、リガンド化合物添加のタイミングで標的タンパク質の iPM 局在化を独立に誘導できることが明らかとなり、直交性を有していることを実証できた。

次に、4.3.9 項で確立した K6-SNAP 融合 RasGRF1(Cdc25)と K6sp-eDHFR 融合 iSH を用いることで、単一細胞内で Ras/ERK 経路と PI3K/Akt 経路の活性化の独立制御システムの構築に取り組んだ (図 79)。本システムを確立するためには、K6-SNAP と K6sp-eDHFR の局在移行の他に、Ras/ERK 経路と PI3K/Akt 経路の活性をモニターするための ERK-KTR と AKT-KTR を共発現させ、これら 4 種類のタンパク質の局在移行を単一細胞内で同時にモニターする 1 細胞 4 色イメージング技術の確立が必要となる (図 79)。4 色イメージングにおいては、使用する蛍光タンパク質の選定だけでなく、励起光や検出波長の設定が重要となる^[4-11]。種々の検討を行い、EGFP (緑色蛍光)、miRFP703 (近赤外蛍光)、mKO (橙色蛍光)、nTurquoise2 (シアン色蛍光) の 4 色種類の蛍光タンパク質を用いて、K6-SNAP-EGFP-RasGRF1(Cdc25)、K6-eDHFR-miRFP703-iSH、ERK-KTR(mKO)、AKT-KTR(nTurquoise2)をそれぞれ設計し、これら 4 種類のタンパク質を恒常共発現する HeLa 細胞を用いて 4 色イメージングを行った^{[4-11][4-12][4-13][4-14]}。4 色イメージングは、共焦点レーザー顕微鏡を図 80 に示した励起/検出条件に設定し行った。観察結果を図 81 に示した。初期状態では、K6-SNAP-EGFP-RasGRF1(Cdc25)と K6-eDHFR-miRFP703-iSH は細胞全体を拡散し、ERK-KTR(mKO)と AKT-KTR(nTurquoise2)は核内に集積した (図 81a, b ①時点)。したがって、これら 4 種のタンパク質発現だけでは Ras/ERK 経路、PI3K/Akt 経路は活性化しないことを示した。ここに、まず **mgcBCP** を添加すると K6-SNAP-EGFP-RasGRF1(Cdc25)が 15 min 程度かけて iPM 局在化した (図 81a, b)。RasGRF1(Cdc25)の iPM 局在化に伴い、ERK-KTR(mKO)の核外への移行が起こり Ras/ERK 経路が活性化したことを示した (図 81a, b ②時点)。このとき、K6-eDHFR-miRFP703-iSH は細胞全体を拡散した状態が維持され、AKT-KTR(nTurquoise2)は核内に集積したままであった (図 81a, b ②時点)。**mgcBCP** を添加してから 30 min 後に **mgcTMP** を添加した結果、K6sp-eDHFR-miRFP703-iSH の iPM 局在化が 5 min 程度で誘導され、AKT-KTR(nTurquoise2)の核外へ移行し、PI3K/Akt 経路の活性化が示された (図 81a, b ③時点)。意外なことに、PI3K/Akt 経路の活性化は、ERK-KTR(mKO)の核外移行が促進した (図 81a, b ③時点)。

この結果は、PI3K/Akt 経路が Ras/ERK 経路を活性化することを示唆した。

4 色イメージングで示唆された、PI3K/Akt 経路と Ras/ERK 経路のクロストークを更に検討するために、K6-SNAP-EGFP-RasGRF1(Cdc25)、ERK-KTR(mKO)、AKT-KTR(nTurquoise2)を共発現させた細胞で 3 色イメージングを行った (図 82a)。リガンド化合物添加前は、K6-SNAP-EGFP-RasGRF1(Cdc25)は細胞全体を拡散し、ERK-KTR(mKO)と AKT-KTR(nTurquoise2)は核内に集積した (図 82b, c ①時点)。ここに **mgcBCP** を添加すると、K6-SNAP-GFP-RasGRF1(Cdc25)は iPM に局在移行し、ERK-KTR(mKO)の核外移行が誘導され、Ras/ERK 経路の活性化を示した (図 82b, c ②時点)。続けて、**mgcTMP** を添加したが AKT-KTR(nTurquoise2)は核内に留まり続け、ERK-KTR(mKO)の核外移行は促進されなかった (図 82b, c ③時点)。これらの結果は、Ras/ERK 経路の活性化によって、Akt が活性化しないことを示している。また、RasGRF1(Cdc25)の iPM 局在化が、Ras/ERK 経路を選択的に活性化することを示している。さらに、PI3K/Akt 経路の活性化が、**mgcTMP** に由来するアーティファクトではなく、K6sp-eDHFR 融合 iSH の iPM 局在化によって誘導されていることを明らかにできた。

同様の手法で、PI3K/Akt 経路の活性化による Ras/ERK 経路の活性化の有無を検討した。K6-eDHFR-miRFP703-iSH、ERK-KTR(mKO)、AKT-KTR(nTurquoise2)を共発現させた細胞を用いた 3 色イメージングにより検討した (図 83a)。リガンド化合物添加前は、K6sp-eDHFR-miRFP703-iSH は細胞全体を拡散し、ERK-KTR(mKO)と AKT-KTR(nTurquoise2)は核内に集積した (図 83b, c ①時点)。ここに **mgcBCP** を添加しても、ERK-KTR(mKO)と AKT-KTR(nTurquoise2)は核内に留まり続けた (図 83b, c ②時点)。この結果は、Ras/ERK 経路の活性化が、**mgcBCP** に由来するアーティファクトではなく、K6-SNAP 融合 RasGRF1(Cdc25)の iPM 局在化によって誘導されていることを示している。続けて、**mgcTMP** を添加すると K6sp-eDHFR-miRFP703-iSH は iPM へ局在移行し、AKT-KTR(nTurquoise2)の核外移行が誘導され、PI3K/Akt 経路の活性化を示した (図 83b, c ③時点)。さらに、PI3K/Akt 経路の活性化に伴い、ERK-KTR(mKO)の核外移行が促進されることが明らかとなり、4 色イメージングで確認された ERK-KTR(mKO)の核外移行促進の再現が得られた (図 83b, c ③時点)。これらの結果は、PI3K の下流シグナルの活性化が、ERK を活性化するシグナル経路間のクロストークの存在を示唆している。PI3K の iPM 局在化による PIP3 生産誘導は、Akt だけでなく細胞運動を制御する Rac 経路の活性化させることが知られており、Rac 経路は Raf を活性化することで ERK 活性化を誘導することが知られている^[4-15]。したがって、PI3K に由来する Rac 経路の活性化が、ERK の活性化を誘導したものと推察する (図 84)。

以上の結果より、K6-SNAP と K6sp-eDHFR システムを併用することで、Ras/ERK 経路と PI3K/Akt 経路の独立制御技術を確立し、4 色イメージングにより 2 種類のシグナル伝達経路の活性化をリアルタイムにモニターすることに成功した。本技術は、複数の細胞内シグナル間のクロストーク・フィードバックが鍵となる細胞機能を解明するための強力なアプローチになるものと期待できる。

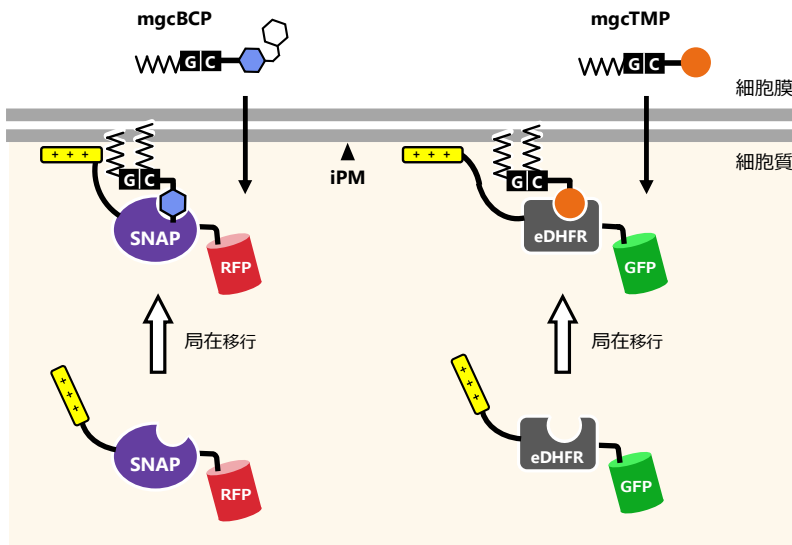


図 77 K6-SNAP と K6sp-eDHFR の iPM 局在移行の独立制御の概略図

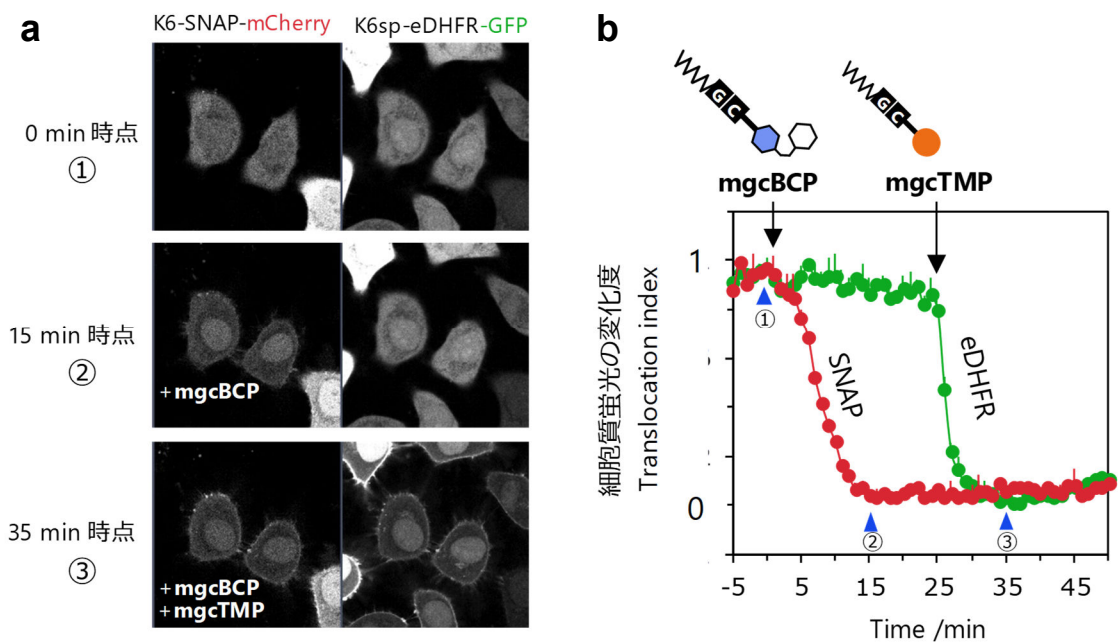


図 78 K6-SNAP と K6sp-eDHFR の iPM 局在移行の独立制御;

(a) K6-SNAP-mCherry, K6sp-eDHFR-GFP 共発現 HeLa 細胞のタイムラプスイメージングの結果 (10 μ M **mgcBCP**, 10 μ M **mgcTMP**), (b) (a)のイメージングデータを基にした局在移行速度の解析結果 (青矢印: (a)の観察像との対応を示す)

共焦点レーザー顕微鏡観察; GFP channel: Ex. 488 nm, Em. 493-574 nm, mCherry channel: Ex. 543 nm, Em. 578-696 nm, zoom = 1.5x

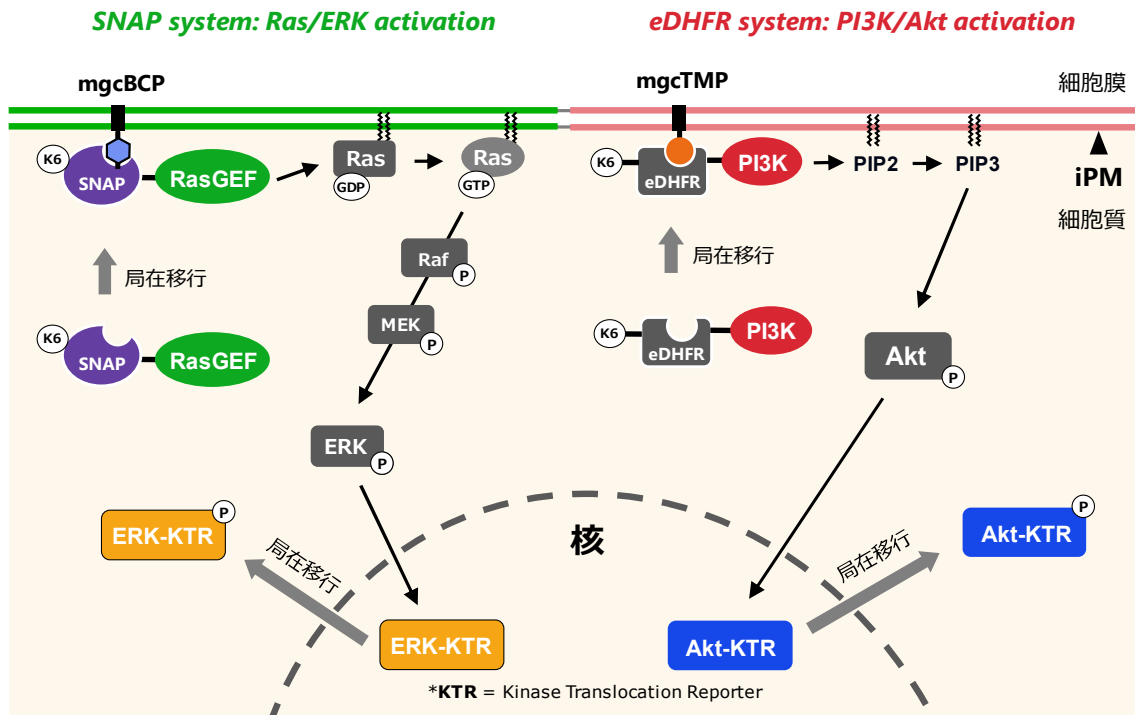


図 79 4色イメージング: K6-SNAP システムと K6sp-eDHFR システムの併用による Ras/ERK 経路と PI3K/Akt 経路の独立制御の概略

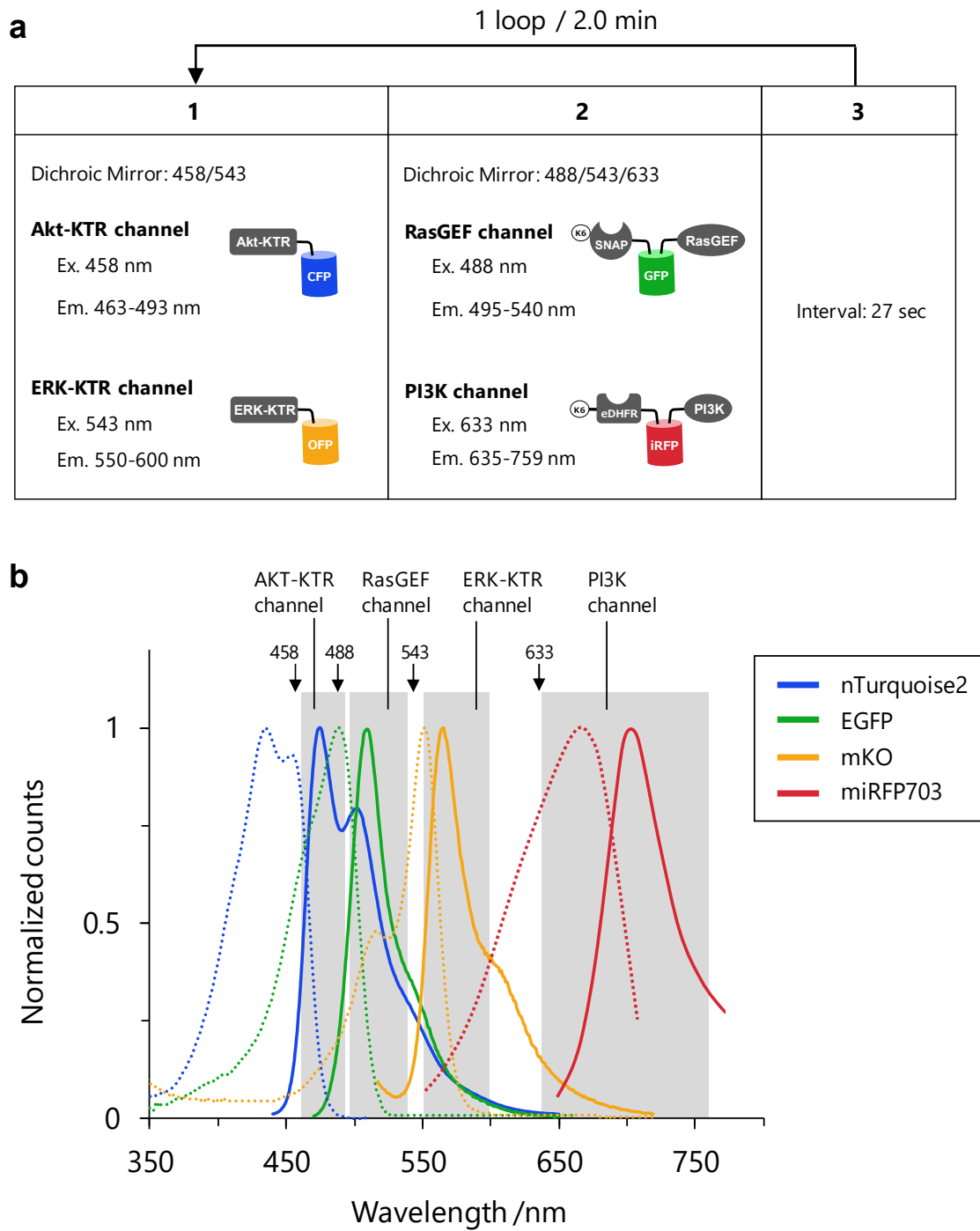


図 80 4色イメージングの観察条件; (a) 共焦点レーザー顕微鏡の設定, (b) 使用した蛍光タンパク質の吸収／蛍光スペクトル; 点線は吸収スペクトルを示す。実線は蛍光スペクトルを示す。黒矢印は励起に使用したレーザーの波長を示す。灰色の網掛けは観察時に検出した波長域を示す。

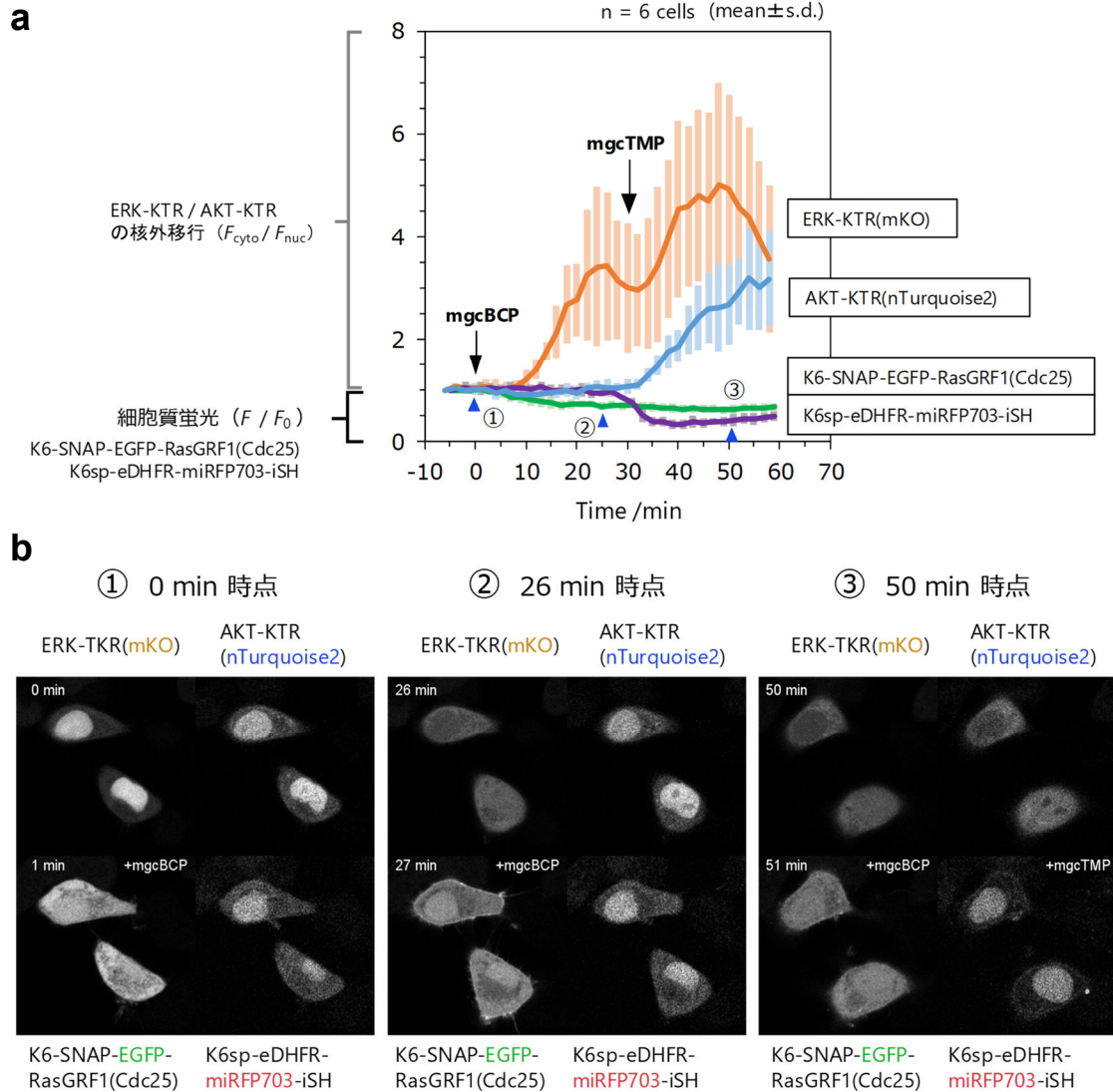


図 81 4色イメージング: K6-SNAP システムと K6sp-eDHFR システムの併用による Ras/ERK 経路と PI3K/Akt 経路の独立制御; (a) (b)のイメージングデータを基にした局在移行速度の解析結果 (青矢印: (b)の観察像との対応を示す), (b) K6-SNAP-EGFP-RasGRF1(Cdc25), K6sp-eDHFR-miRFP703-iSH, ERK-KTR(mKO), AKT-KTR(nTurquoise2) 共発現 HeLa 細胞のタイムラプスイメージングの結果 (10 μ M **mgcBCP**, 10 μ M **mgcTMP**), 共焦点レーザー顕微鏡観察; 図 80 参照, zoom = 1.5x

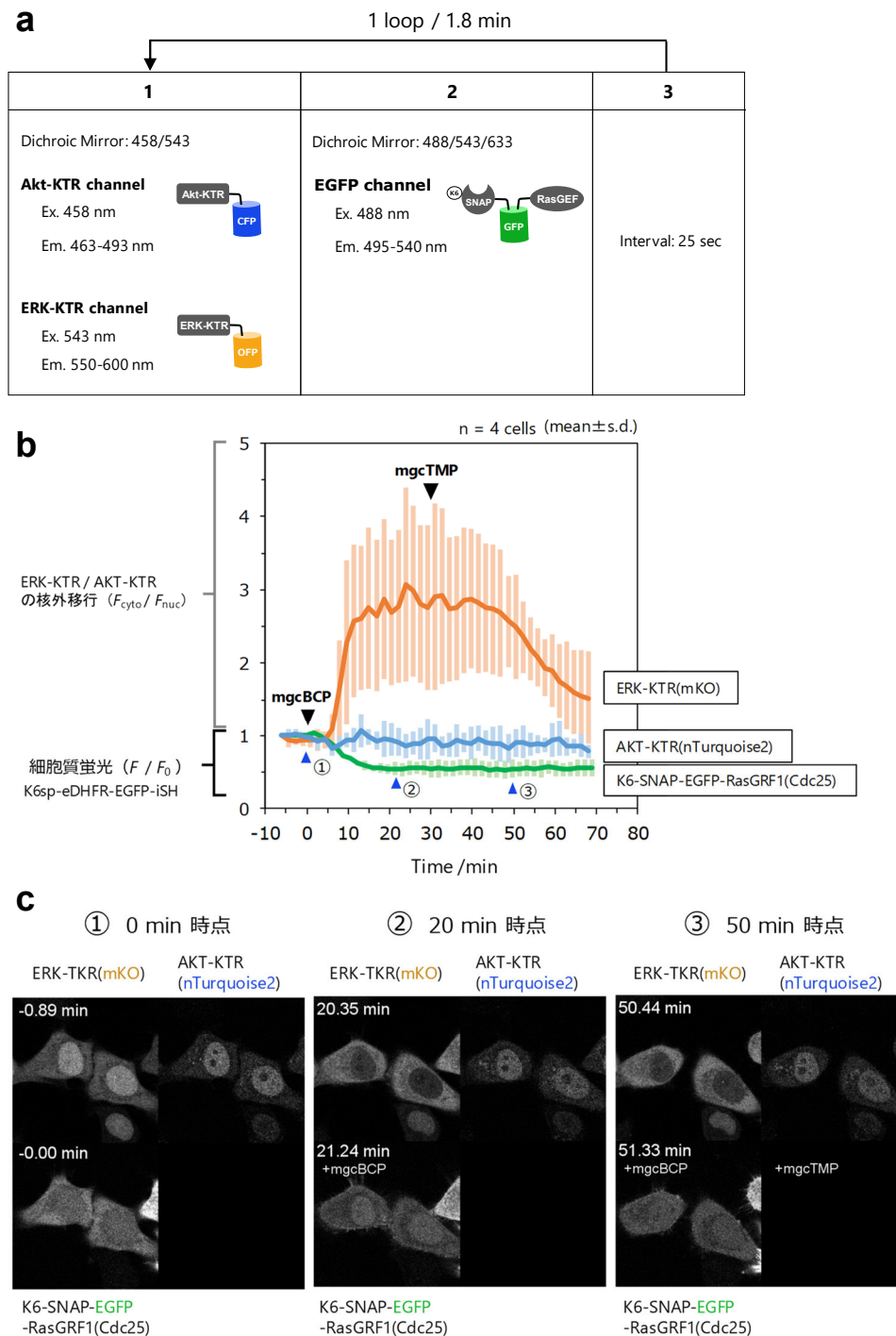


図 82 3色イメージング: K6-SNAP システムを用いた Ras/ERK 経路活性化時の PI3K/Akt 経路の応答; (a) 3色イメージングの観察条件, (b) (c)のイメージングデータを基にした局在移行速度の解析結果 (青矢印: (c)の観察像との対応を示す), (c) K6-SNAP-EGFP-RasGRF1(Cdc25), ERK-KTR(mKO), AKT-KTR(nTurquoise2) 共発現 HeLa 細胞のタイムラプスイメージングの結果 (10 μM **mgcBCP**, 10 μM **mgcTMP**), 共焦点レーザー顕微鏡観察; (a)参照, zoom = 1.5x

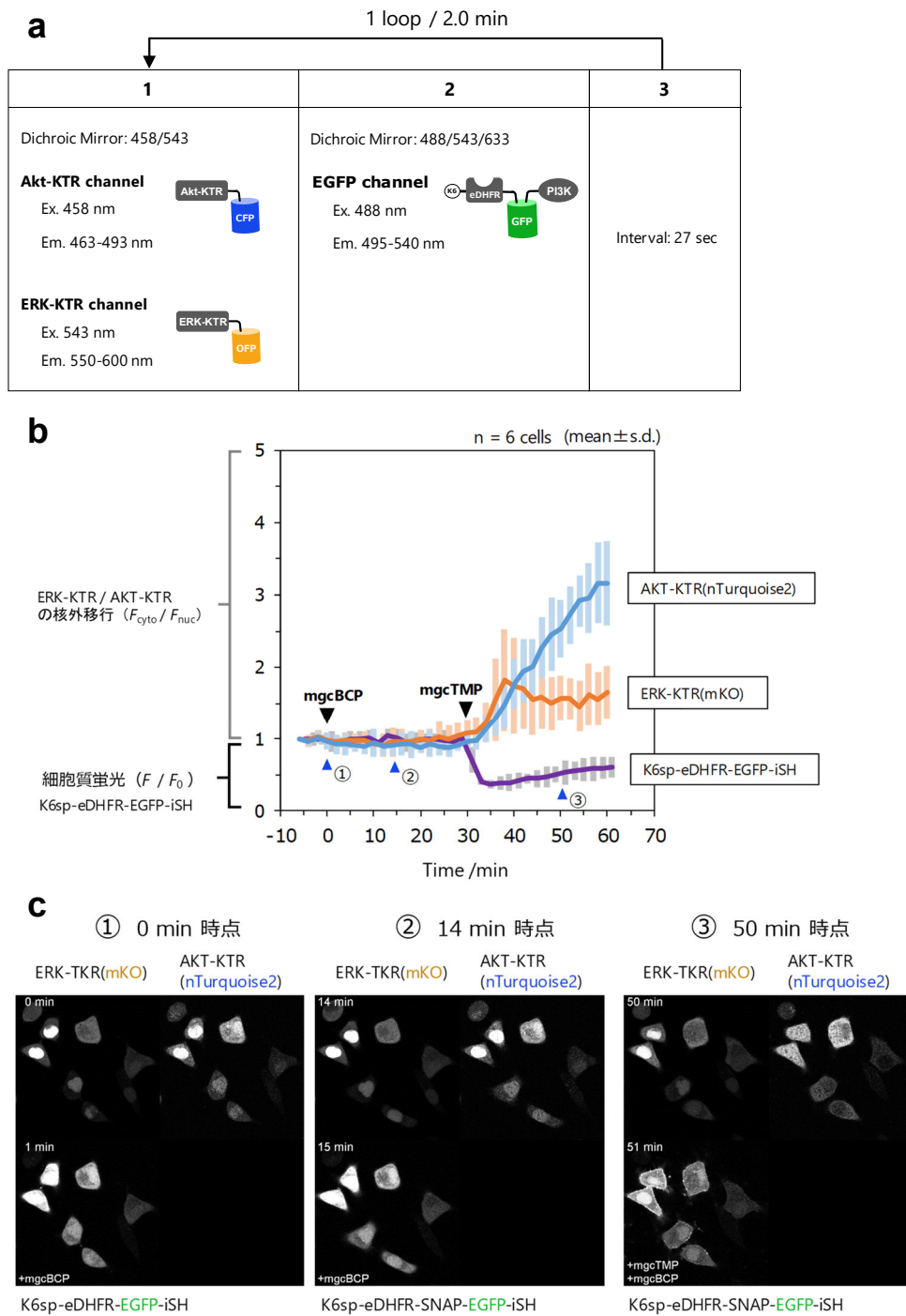


図 83 3色イメージング: K6sp-eDHFR システムを用いた PI3K/Akt 経路活性化時の Ras/ERK 経路の応答; (a) 3 色イメージングの観察条件, (b) (c)のイメージングデータを基にした局在移行速度の解析結果 (青矢印: (c)の観察像との対応を示す), (c) K6sp-eDHFR -EGFP-iSH, ERK-KTR(mKO), AKT-KTR(nTurquoise2) 共発現 HeLa 細胞のタイムラプスイメージングの結果 (10 μ M **mgcBCP**, 10 μ M **mgcTMP**), 共焦点レーザー顕微鏡観察; (a)参照, zoom = 1.0x

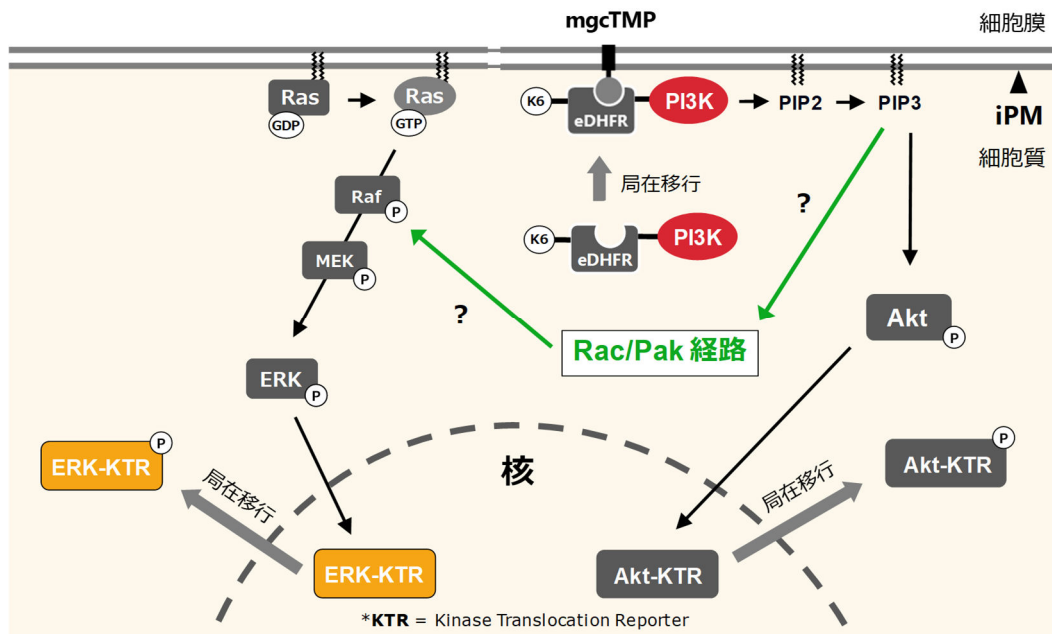


図 84 4色イメージングの結果を基に推察した PI3K を起点とした ERK 活性化のメカニズム
(緑矢印: 推察されるクロストーク)

4.4 結論

本章では、iPM に自発的に局在化する小分子リガンド化合物 (iPM 局在性リガンド) の汎用的な分子設計戦略の確立と、iPM 局在性リガンドを用いたタンパク質の iPM 局在移行誘導に基づく細胞内シグナルの人工活性化システムの構築を目指した。

前半では、iPM 局在性 TMP リガンド (**mgcTMP**) を開発し、標的タンパク質である eDHFR を細胞質から iPM (と一部ゴルジ体) へ連行し、そこにアンカリングできることを実証した。また、eDHFR に Ras/ERK 経路の活性化因子である SOScat を連結することで、**mgcTMP** を用いた eDHFR 融合 SOScat の iPM 局在移行誘導に基づく Ras/ERK 経路の人工活性化に成功した。

次に、この **mgcTMP**/eDHFR システムと直交性を有する第 2 のシステムとし BCP リガンドをベースとした SNAP タグの局在移行誘導を用いたシステムの開発を行い、両システムを併用したタンパク質の iPM 局在化の独立制御に基づく細胞内シグナルの人工活性化ツールの開発を目指した。しかし、開発当初 SNAP タグは、リガンド添加でゴルジ体に局在化し、その局在化効率も低いことが明らかとなった。種々の検討の結果、iPM 局在化モチーフである **mgc** タグと BCP リガンド間のスペーサー長を最適化した局在性 BCP (**mgcBCP**) を用いることで、SNAP の局在移行効率を大きく改善することに成功した。また、SNAP タグの N 末端ヘリジンを導入した K6-SNAP を用いることで局在移行を iPM 選択的に誘導することに成功した。K6-SNAP の iPM 局在化は、**mgcBCP** 添加後 15 min 程度で完結し、局在移行に基づくシグナル活性化に応用可能な十分な移行速度を有していることが明らかとなった。さらに、eDHFR の N 末端にリジン連結した K6sp-eDHFR は、**mgcTMP** の添加で iPM 選択的な局在化を達成し、タンパク質末端部位へのリジン残基の導入がタンパク質局在移行時の iPM 選択性を向上させるための汎用的な分子設計戦略となることが明らかとなった。

本章において開発した **mgcBCP**/K6-SNAP と **mgcTMP**/K6sp-eDHFR は、直交性を有しており、両システムを併用することで、単一細胞内で 2 種類のタンパク質 (K6-SNAP と K6sp-eDHFR) の iPM 局在化を独立に制御できることを実証した。さらに、K6-SNAP 融合 RasGRF1(Cdc25)と K6sp-eDHFR-iSH を細胞に共発現させることで、単一細胞内で Ras/ERK 経路と PI3K/Akt 経路を iPM 局在リガンド (**mgcBCP**, **mgcTMP**) 添加のタイミングで独立に活性化誘導することに成功した。この細胞に ERK 活性や Akt 活性をモニターできるタンパク質プローブを追加で共発現させ、単一細胞内で RasGRF1(Cdc25), iSH の iPM 局在化をモニターしつつ ERK, Akt の活性化をリアルタイムにモニターする 4 色イメージングにより、Ras/ERK 経路と PI3K/Akt 経路間のクロストークをリアルタイムでモニターすることに成功した [4-15]。

今回確立した、**mgcBCP**/K6-SNAP と **mgcTMP**/K6sp-eDHFR を用いた細胞内シグナルの独立制御技術は、4 色イメージングとの組み合わせにより、さまざまなシグナル伝達経路間のクロストークやフィードバックをリアルタイムにモニターし、そのメカニズムを正確に解析するための強力な基盤技術になるものと期待できる。

4.5 実験方法

4.5.1 化合物合成に使用した試薬、測定装置

実験に用いた試薬は精製すること無く購入品のまま使用した。薄層クロマトグラフィー (TLC)は、TLC アルミシート シリカゲル 60 F₂₅₄ (Merck)を用いて行った。フラッシュカラムクロマトグラフィーは、シリカゲル 60 N (球状、中性、40-50 μm)を用いて行った。逆相 HPLC 精製は、YMC-Pack ODS-A column (20 x 250 mm)を Hitachi LaChrom Elite system に接続し、220 nm の UV 吸収をモニターしつつ行った。¹H-NMR スペクトルは JEOL AL-400 (400 MHz)を用いて測定し、ケミカルシフト (d ppm)は tetramethyl silane のピーク (0 ppm)を基準に決定した。¹H-NMR スペクトルからは、次の情報を取得した。ケミカルシフト, 積分値, s = singlet, d = doublet, t = triplet, m = multiplet, 結合定数 (*J*)

High-resolution mass (HRMS)解析は、桑田啓子博士(ITbM, 名古屋大学)に行って頂いた。

試薬の省略表記

DIPEA: *N, N*-diisopropylethylamine

DMF: *N, N*-dimethylformamide

DMSO: dimethyl sulfoxide

HBTU: *O*-(benzotriazole-1-yl)-*N, N, N', N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate

HOBt: 1-hydroxybenzotriazole (monohydrate)

TFA: trifluoroacetic acid

TIPS: triisopropylsilane

4.5.2 TMP-COOH の合成

本項には、mgcTMP の合成に必要となる TMP-COOH の合成方法を示した^[4-16]。

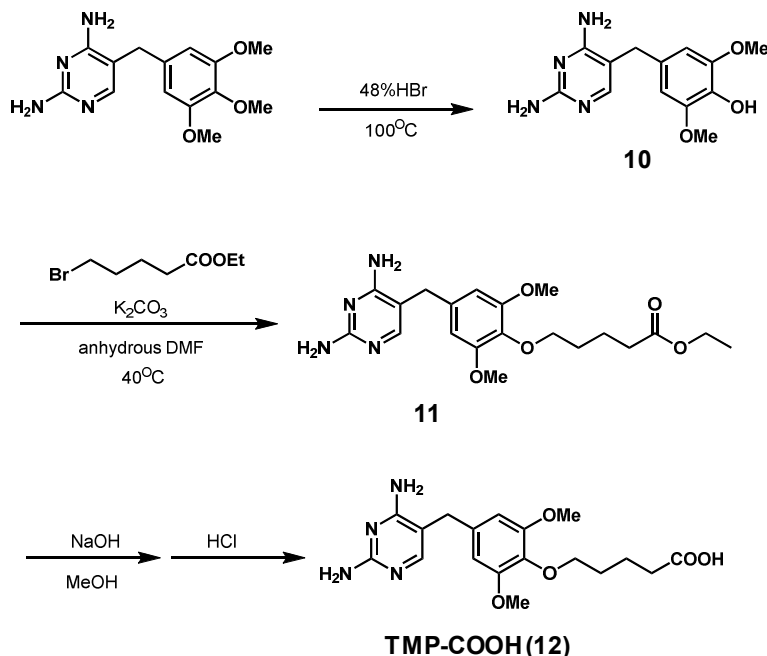


図 85 TMP-COOH (12)の合成スキーム

化合物 **10** の合成

48% HBr (300 mL) に trimethoprim (25 g, 86.2 mmol) を溶解させ、100°C で 20 min 撹拌した。その後、50% NaOH (60 mL) を慎重に添加し反応を終了させた。反応溶液を室温まで冷却した後、4°C で一晩静置し化合物を結晶化させた。得られた結晶を吸引ろ過で回収し、4°C で冷却した H₂O (100 mL) で結晶を洗浄した。沸騰した H₂O (200 mL) に回収した結晶を溶解させ、28% アンモニア水を用いて pH 7 に調節した後、一晩 4°C に静置し再結晶化させた。白色結晶を吸引ろ過で回収し、4°C で冷却した H₂O (100 mL) とアセトン (50 mL x3) で洗浄した。デシケーター (40°C) で減圧乾燥した後、化合物 **10** を白色粉体として得た (19.4 g, 70.2 mmol, 81%)。

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8.25 (1H, s), 7.88 (2H, s), 7.38 (2H, s), 7.35 (1H, s), 6.56 (2H, s), 6.40 (1H, m), 6.29 (1H, m), 3.73 (6H, s), 3.54 (2H, s)

化合物 **11** の合成

DMF (25 mL) に化合物 **10** (5.0 g, 18.1 mmol) を溶解させた。ここに K₂CO₃ (5.0 g, 36.2 mmol) と ethyl 5-bromovalerate (4.3 mL, 27.2 mmol) を添加し、40°C で 8 h 撹拌した後、室温まで冷却した。反応の進行は TLC (silica, CHCl₃:MeOH = 5:1) で追跡した。吸引ろ過を行い、ろ液をエバポレーターで濃縮した後、EtOAc (100 mL) に溶解した。分液操作により EtOAc 層を NaHCO₃ aq. (50 mL x2) と sat. NaCl aq. (50 mL) で洗浄した後、無水 Na₂SO₄ を添加し脱水した。得られた粗生成

物を、湿式カラムクロマトグラフィー (silica, CHCl₃: MeOH = 100:1 → 50:1 → 40:1 → 30:1 → 20:1)により精製した。回収したフラクションを濃縮した後、化合物 **11** を白色粉体 (2.0 g, 4.94 mmol, 27%) として得た。

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 7.51 (1H, s), 6.54 (2H, s), 6.07 (2H, s), 5.67 (2H, s), 4.05 (2H, m), 3.78 (2H, t, *J* = 6.0 Hz), 3.71 (6H, s), 3.52 (2.06 s), 2.34 (2H, t, *J* = 7.2 Hz), 1.69 (2H, m), 1.62 (2H, m), 1.18 (3H, t, 7.2 Hz)

TMP-COOH (12)の合成

MeOH (17 mL) に化合物 **11** (2.0 g, 4.94 mmol) を溶解させた。5 M NaOH (3.0 mL, 14.8 mmol) を添加し、室温で 2.5 h 攪拌した。反応進行は TLC (silica, CHCl₃:MeOH = 2:1)でモニターした。エバポレーションにより濃縮した後、40 mL H₂O に化合物を溶解させた。その後、35% HCl を用いて pH 4 に調節し、生成した沈殿物を吸引ろ過により回収し、4℃で冷却した H₂O (100 mL) で洗浄した。減圧乾燥の後、**TMP-COOH** を白色粉体 (1.57 g, 4.17 mmol, 84%) として得た。

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 7.51 (1H, s), 6.54 (2H, s), 6.09 (2H, s), 5.70 (2H, s), 3.77 (2H, t, *J* = 5.4 Hz), 3.71 (6H, s), 2.26 (2H, t, *J* = 6.6 Hz), 1.62 (4H, m)

4.5.3 mgcTMP の合成

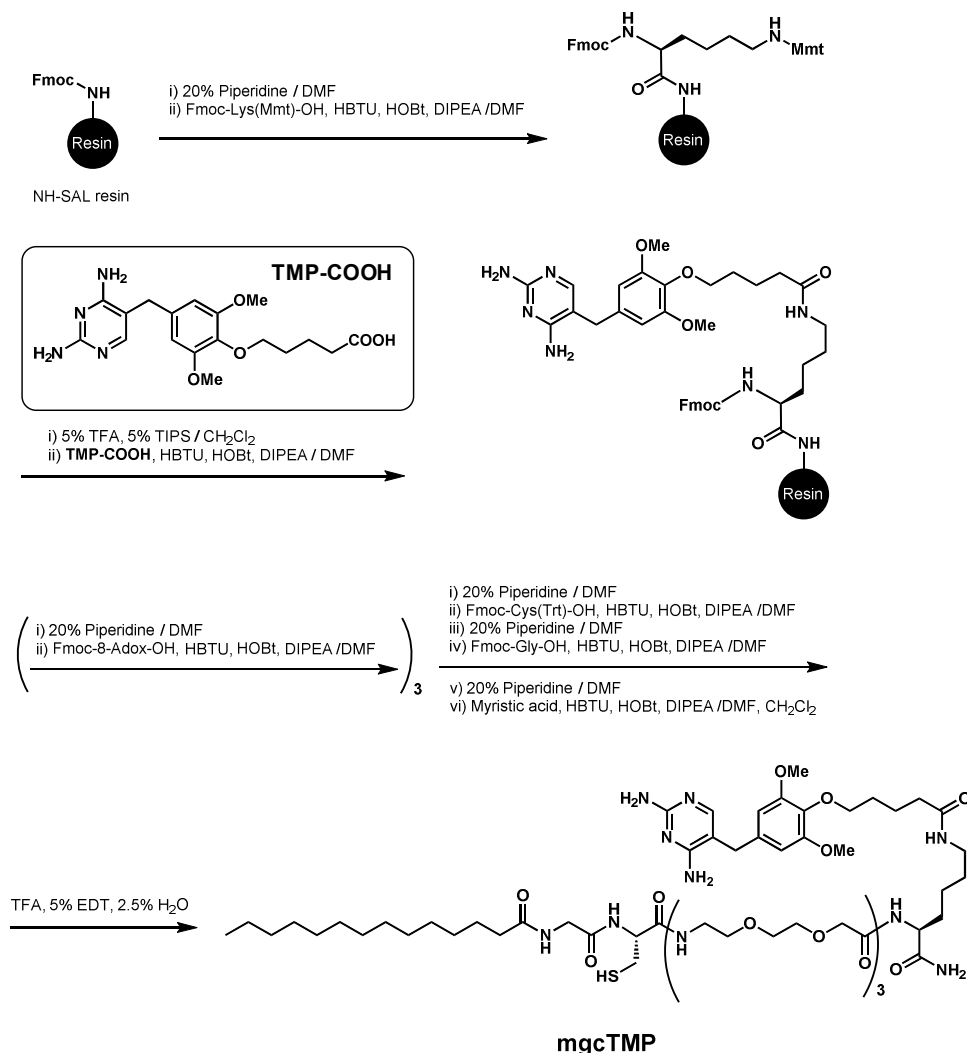


図 86 mgcTMP の合成スキーム

mgcTMP は、Fmoc ペプチド固相合成法により Rink Amide resin 上で合成した。全ての脱 Fmoc 反応は、15% piperidine/DMF 中で 15 min 攪拌することで行った。アミノ酸の縮合反応は、DMF に Fmoc 保護アミノ酸 (4.1 eq.)、HBTU (4.0 eq.)、HOBT (4.0 eq.)、DIPEA (8.0 eq.) を溶解させたカップリング溶液を調製し室温で攪拌することで行った。全ての Fmoc の脱保護は Kaiser テストでモニターした^[4-17]。各ステップにおける樹脂洗浄は、DMF を用いて行った。

Rink Amide resin (0.65 mmol/g)(185 mg, 120 μmol)の脱 Fmoc 反応を行い DMF で洗浄した。次に、Fmoc-Lys(Mtt)-OH を導入した。MeOH→CH₂Cl₂ の順に洗浄した後、5% TFA, 5% TIPS / CH₂Cl₂ 処理により Mtt を脱保護し、CH₂Cl₂→MeOH→DMF の順に洗浄した。その後、DMF に **TMP-COOH** (3.1 eq.)、HBTU (3.0 eq.)、HOBT (3.0 eq.)、DIPEA (6.0 eq.) を溶解させたカップリング溶液を用いてリジン残基側鎖に **TMP-COOH** を導入した。その後は、脱 Fmoc 反応と縮合反応を繰り返すことで、リジン残基の N 末端に Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-Gly-OH を導入した。次に、

DMF/CH₂Cl₂ (1/1)にミリスチン酸 (4.1 eq.)、HBTU (4.0 eq.)、HOBt (4.0 eq.)、DIPEA (8.0 eq.) をカップリング溶液用いてミリスチン酸を導入することで N 末端を終端した。TFA に 5% EDT、2.5% H₂O を添加した反応溶液を用いて、Cys 側鎖の Trt の脱保護と樹脂からの化合物の切り出しを行った。粗生成物を Et₂O で沈殿させた後、逆相 HPLC (C18 カラム, CH₃CN(0.1%TFA) /H₂O(0.1%TFA))により精製した。凍結乾燥後、**mgcTMP** を白色粉体 (43 mg, 25% 1TFA 塩) で取得した。

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 7.23 (1H, s), 6.56 (2H, s), 4.51 (1H, m), 4.42 (1H, m), 4.03 (2H, s), 4.00 (4H, s), 3.92 (2H, t, *J* = 6.0 Hz), 3.88 (2H, s), 3.80 (6H, s), 3.66 (14H, m), 3.59 (6H, m), 3.45 (4H, m), 3.41 (2H, m), 3.18 (2H, t, *J* = 6.8 Hz), 2.86 (2H, m), 2.26 (4H, m), 1.80 (2H, m), 1.71 (2H, m), 1.62 (2H, m), 1.52 (2H, m), 1.38 (2H, m), 1.28 (22H, m), 0.89 (3H, t, *J* = 6.6 Hz).

HRMS (ESI): calcd for [M+H]⁺, 1309.7436; found, 1309.7442.

***mgc-(Adox)_n-BCP**, **mBCP**, **mgsBCP**, **mgaBCP** の合成は、沖超二 氏 (築地真也研究室) が行った。

4.5.4 プラスミド作製

本項では、実験に使用したプラスミドの作製方法を記した。表 2 に MTA 契約により分与して頂いたプラスミドの一覧を示した。表 3 には、本項で作製したプラスミドの一覧を示した。表 4 には、表 3 に示したプラスミドの作製に使用したプライマーの一覧を示した。110 ページから 114 ページには、表 3 に示したプラスミドの作製方法の詳細を記した。

表 2 MTA 契約により分与して頂いたプラスミド

No.	Plasmid	Supplier
1	pBAD-eDHFR	Teruyuki Nagamune (Tokyo University)
2	CF-iSH	Tobias Meyer (Addgene #20159)
3	HA-SOS1	Dafna Bar-Sagi (Addgene #32920)
4	pPBpuro-MCS	Michiyuki Matsuda (Kyoto University)
5	RasGRF1	Kazusa DNA Res. Inst. (Clone name: pF1KB9098)
6	pLAMP1-miRFP703	Vladislav Verkhusha (Addgene #79998)
7	pHGEA	Kazuhiro Aoki (Okazaki Institute for Integrative Bioscience, National Institutes of Natural Sciences)
8	pPBbsr2-MCS	Michiyuki Matsuda (Kyoto University)
9	pCSIIbleo-Akt-KTR-FoxO3a_S294/S315/S344A-nTurquoise2	Kazuhiro Aoki (Okazaki Institute for Integrative Bioscience, National Institutes of Natural Sciences)
10	pPB-CAG.EBNXN	Kosuke Yusa, Roland Rad, Junji Takeda and Allan Bradley (Wellcome Trust Sanger Institute)
11	mPB	Juan Cadiñanos and Allan Bradley (Wellcome Trust Sanger Institute)
12	pCXN2-mEGFP-xERK2WT	Michiyuki Matsuda (Kyoto University)
13	pFlag-xMEK1	Michiyuki Matsuda (Kyoto University)

表 3 作製したプラスミド

No.	Plasmid
1	pSNAP-GFP
2	pK6-SNAP-GFP
3	pK6-SNAP-mCherry
4	pK3-SNAP-GFP
5	pK6-SNAP-GFP-C1
6	pK6-SNAP-GFP-sp-C1
7	peDHFR-GFP
8	pK6-eDHFR-GFP
9	pK6sp-eDHFR-GFP
10	pK6sp-eDHFR-GFP-sp-C1
11	pK6sp-eDHFR-GFP-sp-iSH
12	pmCherry-eDHFR-C1
13	pmCherry-eDHFR-SOScat
14	pBSSK(-)_PB
15	pmCherry-eDHFR-C1/BSSK(-)_PB
16	pPBpuro-MCS(AN)
17	pPBpuro-SNAP-GFP
18	pPBpuro-K3-SNAP-GFP
19	pPBpuro-K6-SNAP-GFP
20	pPBpuro-K6-SNAP-GFP-sp-C1
21	pK6-SNAP-GFP-RasGRF1(Cdc25)
22	pPBpuro-K6-SNAP-GFP-RasGRF1(Cdc25)
23	pPBpuro-eDHFR-GFP
24	pPBpuro-K6-eDHFR-GFP
25	pPBpuro-K6sp-eDHFR-GFP
26	pPBpuro-K6sp-eDHFR-GFP-C1
27	pPBpuro-K6sp-eDHFR-GFP-iSH
28	pPBpuro-SD
29	pPBbsr2-ERK-KTR(mKO)
30	pPBbsr2-AKT-KTR(nTurquoise2)
31	pPBbsr2-EA
32	pPBbsr2-ERK-KTR(mCherry)

表 4 プラスミド作製に使用したプライマー

Primer	Sequence (5' → 3')
P1	GCTTCGAATTCTGCAGACCATGGACAAAGACTGC
P2	ATGGTGGCGACCGGTGGATCCGAAGCGGCCGCACCCAGCCAGGCTT
P3	GCTTCGAATTCTGCAGACCATGAAAAAAGAAAAAGAAAGGACGCGGTGCTGACAAAGACTGCGAA
P4	ATGGTGGCGACCGGTGGATCCGAAGCGGCCGCACCCAGCCAGGCTT
P5	GCTTCGAATTCTGCAGACCATGAAAAAGAGGGTGGCGGTGGCAGCGGTGCTGACAAAGACTGCGAA
P6	GCGCGCTAGCGCTTCCGGTCGCCACCATGAAAAAAGAAAAAGAAAGGC
P7	GCGCACCGGTGGGTCCGAAGCGGCCGCACCCAGCCAGG
P8	CCGCGCGGCGTCTGACAAGGTAGTGGTGTGGCTCTGGTGTGGTAGTGCGCTGTTCCGGTCTGGCTCTGGCGCGCTCGAGATGGTGAGCAAGGGC
P9	GCTGCCGCGCGGGGATCCCTTGTACAGCTCGTC
P10	AAACTGCAGACCATGGCTATCAGTCTGATTGCGGCGTTAGCG
P11	CGCGGATCCGAAGCGGCCGCCGCGCTCCAGAAT
P12	GCTTCGAATTCTGCAGACCATGAAAAAAGAAAAAGAAATCAGTCTGATTGCG
P13	CGGGCCCTCGAGCTTGACAGCTCGTC
P14	GGTGCCAGTGTGGTGGTGGCAGCGGTGCTGGTCCGGCGCTATCAGTCTGATTGCG
P15	GCGGGCCCGGCTAGCATGAAAAAAGAAAAAGAAAGGCTCCGGTGCCAGTGTGGT
P16	ATGGACGAGCTGTACAAGAGTGTGGTGGTATCAGTCTGATTGCG
P17	AGCTTGAGCTCGAGGACCACGACTACCACGACTACCACGACTACCACGACTACCACGACTACCACGACTCCGCGCTCCAGAAT
P18	CTCGAGCTCAAGCTTCGAGATGAGGCTGCCT
P19	ATCCCGGGCCGCGGTTAGGTACCTGGTCTTGG
P20	CCAATTGTAGTAGCTCGACGAAGCTTGCAATTACCCGGGGC
P21	GGCCGCCCGGGTAATGCAAGCTTCGTCGACGCTAGTACAATTGGGTAC
P22	GATCTCACGTCAATTGTCAGGTCCCGGATAAGTC
P23	GACTTATCCCGGACCTGACAATTGACGTGAG
P24	GCGCGGAATTCTACGCTGGAGGAGATCACG
P25	CGCGCGGATCCGGTGGGAGTTTTGGTTC
P26	GAGATTCTGGAGCGCGG
P27	TAGAGTCCCGGCTAGGTGGGAGTTTTGGTTCTA
P28	ATCCGAATTCCTCGAGATGAAAAAAGAAAAAGAAAGGCA
P29	CCAGCCTGCTTCAGCAGGCTGAAGTTAGTAGTCCGCTTCTCTAGATCCGGTGGATCCGG
P30	GCGACCGGTCGCCACCATGGTAGCAGGTCATGCC
P31	CGCGCTGTACATGCTCTCAAGCGCGGTGAT
P32	GCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCTATGAAAAAAGAAAAAGAAAGGCT
P33	AGCGGCCGCCCTCGAGTTACGTGCGCTCCTCGTGGTGGG
P34	ATCCGAATTCCTCGAGATGAAAGGCCGAAGCCTCG
P35	ACCGCGGCCGTCGA _c TTAGGAGTGGGCCACGGCG
P36	ATCCGAATTCCTCGAGATGGCAGAGGCACCGGCTT
P37	ACCGCGGCCGTCGACTTACTTGACAGCTCGTCCATGC
P38	AGGTCCGGGTTTTCTCGA
P39	GAAAACCCGGACCTATGGCAGAGGCACCGGCTTC
P40	AGCGGCCGCCCTCGAGTTAGTTAACGGATCCTCTAGACAGC
P41	GCCCTTGCTACCATGCGGCCGCCGACGGGAA
P42	ATGGTGAGCAAGGGCGAG

(1) pSNAP-GFP の作製

P1 と P2 を用いて pSNAPf (NEB, N9183S) に対して PCR を行った後に PstI, BamHI で処理した DNA 断片を pEGFP-N1 (Clontech) の PstI, BamHI サイトに挿入することで pSNAP-GFP を作製した。

(2) pK6-SNAP-GFP の作製

P3 と P4 を用いて pSNAPf (NEB, N9183S) に対して PCR を行った後に PstI, BamHI で処理した DNA 断片を pEGFP-N1 の PstI, BamHI サイトに挿入することで pK6-SNAP-GFP を作製した。

(3) pK6-SNAP-mCherry の作製

pK6-SNAP-EGFP を AgeI, BsrGI で処理した DNA 断片を、pmCherry-N1 (Clontech) の AgeI, BsrGI サイトに挿入することで pK6-SNAP-mCherry を作製した。

(4) pK3-SNAP-GFP の作り方

P4 と P5 を用いて pK6-SNAP-GFP に対して PCR を行った後に PstI, BamHI で処理した DNA 断片を pEGFP-N1 の PstI, BamHI サイトに挿入することで pK3-SNAP-GFP を作製した。

(5) pK6-SNAP-GFP-C1 の作製

P6 と P7 を用いて pK6-SNAP-GFP に対して PCR を行った後に NheI, AgeI で処理した DNA 断片を pEGFP-C1 の NheI, AgeI サイトに挿入することで pK6-SNAP-GFP-C1 を作製した。

(6) pK6-SNAP-GFP-sp-C1 の作製

P8 と P9 を用いて pEGFP-N1 に対して PCR を行った後に SalI, BamHI で処理した DNA 断片を pEGFP-C1 の SalI, BamHI サイトに挿入することで pSP-EGFP を作製した。次に、pSP-EGFP を Sal, XhoI で処理することで得た DNA 断片を pK6-SNAP-GFP-C1 の XhoI サイトに挿入することで pK6-SNAP-GFP-sp-C1 を作製した。

(7) peDHFR-GFP の作製

P10 と P11 を用いて pBAD-DHFR (表 2, No.1) に対して PCR を行った後に PstI, BamHI で処理した DNA 断片を pEGFP-N1 の PstI, BamHI サイトに挿入することで peDHFR-GFP を作製した。

(8) pK6-eDHFR-GFP の作製

P12 と P13 を用いて peDHFR-GFP に対して PCR を行った後に PstI, BamHI で処理した DNA 断片を pEGFP-N1 の PstI, BamHI サイトに挿入することで pK6-eDHFR-GFP を作製した。

(9) pK6sp-eDHFR-GFP の作製

P13, P14, P15 を用いて peDHFR-GFP に対して PCR を行った後に NheI, AgeI で処理した DNA 断片を pEGFP-N1 の NheI, AgeI サイトに挿入することで pK6sp-eDHFR-GFP を作製した。

(10) pK6sp-eDHFR-GFP-sp-C1 の作製

pK6sp-eDHFR-GFP を NheI, AgeI で処理することで得た DNA 断片を、pK6-SNAP-GFP-sp-C1 の NheI, AgeI サイト間の DNA 配列と置き換えることで pK6sp-eDHFR-GFP-C1 を作製した。

(11) pK6sp-eDHFR-GFP-iSH の作製

CF-iSH (表 2, No.2) を XhoI, EcoRI で処理することで得た DNA 断片を pEYFP-C1 の XhoI, EcoRI サイトに挿入することで pEYFP-iSH を作製した。次に、pEYFP-iSH を BsrGI, XhoI で処理することで得た DNA 断片を pmCherry-eDHFR-C1 の BsrGI, XhoI サイトに挿入することで、pEYFP-eDHFR-iSH を作製した。さらに、pEYFP-eDHFR-iSH を XhoI, XmaI で処理することで得た DNA 断片を K6sp-eDHFR-GFP-sp-C1 の XhoI, XmaI サイトに挿入することで pK6sp-eDHFR-GFP-iSH を作製した。

(12) pmCherry-eDHFR-C1 の作製

P16 と P17 を用いて peDHFR-EGFP に対して PCR を行った後に BsrGI, XhoI で処理することで得た DNA 断片を pEYFP-C1 (Clontech) の BsrGI, XhoI サイトに挿入することで pEYFP-eDHFR-C1 を作製した。次に、pEYFP-eDHFR-C1 を BsrGI, XhoI で処理することで得た DNA 断片を pmCherry-C1 に DNA 断片を挿入することで pmCherry-eDHFR-C1 を作製した。

(13) pmCherry-eDHFR-SOScat の作製

P18 と P19 を用いて HA-SOS1 (表 2, No.3) に対して PCR を行った後に HindIII, SacII で処理することで得た DNA 断片を pmCherry-eDHFR-C1 の HindIII, SacII サイトに挿入することで pmCherry-eDHFR-SOScat を作製した。

(14) pBSSK(-)_PB の作製

P20 と P21 をアニーリングさせることで調製した DNA 断片を pBluescript SK II(-) (Agilent Technologies, 212206) の KpnI, NotI サイトに挿入することで、pBSSK(-)_PB を作製した。

(15) pmCherry-eDHFR-C1/BSSK(-)_PB の作製

pmCherry-eDHFR-C1 を NheI, XmaI で処理することで得た DNA 断片を pBSSK(-)_PB に挿入することで pmCherry-eDHFR-C1/BSSK(-)_PB を作製した。

(16) pPBpuro-MCS(AN)の作製

P22 と P23 をアニーリングさせることで調製した DNA 断片を pPBpuro-MCS（表 2, No.4）の BamHI, HincII サイトに挿入することで pPBpuro-MCS(AN)を作製した。

(17) pPBpuro-SNAP-GFP の作製

pSNAP-GFP を NheI, MfeI で処理することで得た DNA 断片を pmCherry-eDHFR-C1/BSSK(-)_PB の NheI, EcoRI サイトに挿入することで pSNAP-GFP/BSSK(-)_PB を作製した。次に、pSNAP-GFP/BSSK(-)_PB を MfeI, XmaI で処理することで得た DNA 断片を pPBpuro-MCS(AN)の MfeI, XmaI サイトに挿入することで pPBpuro-SNAP-GFP を作製した。

(18) pPBpuro-K3-SNAP-GFP の作製

pK3-SNAP-GFP を NheI, MfeI で処理することで得た DNA 断片を pmCherry-eDHFR-C1/BSSK(-)_PB の NheI, EcoRI サイトに挿入することで pK3-SNAP-GFP/BSSK(-)_PB を作製した。次に、pK3-SNAP-GFP/BSSK(-)_PB を MfeI, XmaI で処理することで得た DNA 断片を pPBpuro-MCS(AN)の MfeI, XmaI サイトに挿入することで pPBpuro-K3-SNAP-GFP を作製した。

(19) pPBpuro-K6-SNAP-GFP の作製

pK6-SNAP-GFP を NheI, MfeI で処理することで得た DNA 断片を pmCherry-eDHFR-C1/BSSK(-)_PB の NheI, EcoRI サイトに挿入することで pK6-SNAP-GFP/BSSK(-)_PB を作製した。次に、pK6-SNAP-GFP/BSSK(-)_PB を MfeI, XmaI で処理することで得た DNA 断片を pPBpuro-MCS(AN)の MfeI, XmaI サイトに挿入することで pPBpuro-K6-SNAP-GFP を作製した。

(20) pPBpuro-K6-SNAP-GFP-C1 の作製

pK6-SNAP-GFP-sp-C1 を NheI, XmaI で処理することで得た DNA 断片を pBSSK(-)_PB の NheI, XmaI サイトに挿入することで pK6-SNAP-GFP-sp-C1/BSSK(-)_PB を作製した。次に、pK6-SNAP-GFP-sp-C1/BSSK(-)_PB を MfeI, XmaI で処理することで得た DNA 断片を pPBpuro-MCS(AN)の MfeI, XmaI サイトに挿入することで pPBpuro-K6-SNAP-GFP-C1 を作製した。

(21) pK6-SNAP-GFP-RasGRF1(Cdc25)の作製

P24 と P25 を用いて RasGRF1（表 2, No.5）に対して PCR を行うこと RasGRF1 の Cdc25 ドメインをコードした PCR 産物を取得した。この PCR 産物を EcoRI, BamHI で処理することで得た DNA 断片を pK6-SNAP-GFP-sp-C1 の EcoRI, BamHI サイトに挿入することで pK6-SNAP-GFP-RasGRF1(Cdc25)を作製した。

(22) pPBpuro-K6-SNAP-GFP-RasGRF1(Cdc25)の作製

pK6-SNAP-GFP-C1 を XhoI, MfeI で処理することで得た DNA 断片を pmCherry-eDHFR-C1 の XhoI, MfeI サイトに挿入することで pmCherry-eDHFR-RasGRF1(Cdc25)を作製した。次に、P26 と P27 を用いて pmCherry-eDHFR-RasGRF1(Cdc25)に対して PCR を行った。得られた PCR 産物を XhoI, XmaI で処理することで得た DNA 断片を、pPBpuro-K6-SNAP-GFP-C1 の XhoI, XmaI サイトに挿入することで pPBpuro-K6-SNAP-GFP-RasGRF1(Cdc25)を作製した。

(23) pPBpuro-eDHFR-GFP の作製

peDHFR-GFP を NheI, MfeI で処理することで得た DNA 断片を pmCherry-eDHFR-C1/BSSK(-)_PB の NheI, EcoRI サイトに挿入することで peDHFR-GFP/BSSK(-)_PB を作製した。次に、peDHFR-GFP/BSSK(-)_PB を MfeI, XmaI で処理することで得た DNA 断片を pPBpuro-MCS(AN)の MfeI, XmaI サイトに挿入することで pPBpuro-eDHFR-GFP を作製した。

(24) pPBpuro-K6-eDHFR-GFP の作製

pK6-eDHFR-GFP を NheI, MfeI で処理することで得た DNA 断片を pmCherry-eDHFR-C1/BSSK(-)_PB の NheI, EcoRI サイトに挿入することで pK6-eDHFR-GFP/BSSK(-)_PB を作製した。次に、pK6-eDHFR-GFP/BSSK(-)_PB を MfeI, XmaI で処理することで得た DNA 断片を pPBpuro-MCS(AN)の MfeI, XmaI サイトに挿入することで pPBpuro-K6-eDHFR-GFP を作製した。

(25) pPBpuro-K6sp-eDHFR-GFP の作製

pK6sp-eDHFR-GFP を NheI, MfeI で処理することで得た DNA 断片を pmCherry-eDHFR-C1/BSSK(-)_PB の NheI, EcoRI サイトに挿入することで pK6sp-eDHFR-GFP/BSSK(-)_PB を作製した。次に、pK6sp-eDHFR-GFP/BSSK(-)_PB を MfeI, XmaI で処理することで得た DNA 断片を pPBpuro-MCS(AN)の MfeI, XmaI サイトに挿入することで pPBpuro-K6sp-eDHFR-GFP を作製した。

(26) pPBpuro-K6sp-eDHFR-GFP-C1 の作製

pK6sp-eDHFR-GFP-sp-C1 を NheI, XmaI で処理することで得た DNA 断片を pBSSK(-)_PB の NheI, XmaI サイトに挿入することで pK6sp-eDHFR-GFP-sp-C1/BSSK(-)_PB を作製した。pK6sp-eDHFR-GFP-sp-C1/BSSK(-)_PB を MfeI, XmaI で処理することで得た DNA 断片を pPBpuro-MCS(AN)の MfeI, XmaI サイトに挿入することで pPBpuro-K6sp-eDHFR-GFP-C1 を作製した。

(27) pPBpuro-K6sp-eDHFR-GFP-iSH の作製

pK6sp-eDHFR-GFP-iSH を XhoI, XmaI で処理することで得た DNA 断片を pPBpuro-K6sp-eDHFR-GFP-C1 の XhoI, XmaI サイトに挿入することで pPBpuro-K6sp-eDHFR-GFP-iSH を作製した。

(28) pPBpuro-SD の作製

P28 と P29 を用いて pK6-SNAP-GFP-RasGRF1(Cdc25)に対して PCR を行うことで、DNA 断片-1 を調製した。次に、P30 と P31 を用いて pLAMP1-miRFP703 (表 2, No.6) に対して PCR を行った。その後、得られた PCR 産物を AgeI, BsrGI で処理することで得た DNA 断片を pK6sp-eDHFR-GFP-iSH の AgeI, BsrGI サイトに挿入することで pK6sp-eDHFR-miRFP-iSH を作製した。この pK6sp-eDHFR-miRFP-iSH に対して P32 と P33 を用いて PCR を行うことで、DNA 断片-2 を調製した。DNA 断片-1 と DNA 断片-2 を In-fusion HD Cloning Kit (Clontech)を用いて pPBpuro-MCS の XhoI サイトに挿入することで pPBpuro-SD を作製した。

*SD = K6-SNAP-EGFP-RasGRF1(Cdc25)-p2A-K6sp-eDHFR-miRFP-iSH

*p2A 配列は、タンパク質合成の過程でリボソームにおけるアミド結合形成を一過的に阻害することで、前後にコードされた 2 本のポリペプチド鎖が切り離されることが知られている^[4-18]。これにより p2A 前後にコードされた 2 種類のタンパク質を 1 種類の mRNA から翻訳することが可能となる。

(29) pPBbsr2-ERK-KTR(mKO)の作製

P34 と P35 を用いて pHGEA (表 2, No.7) に対して PCR を行うことで得た DNA 断片を、In-fusion HD Cloning Kit を用いて pPBbsr2-MCS (表 2, No.8) の XhoI サイトに挿入することで pPBbsr2-ERK-KTR(mKO)を作製した。

(30) pPBbsr2-AKT-KTR(nTurquoise2)の作製

pCSIIbleo-Akt-KTR-FoxO3a_S294/S315/S344A-nTurquoise2 (表 2, No.9) に対して P36 と P37 を用いて PCR を行うことで得た DNA 断片を、In-fusion HD Cloning Kit を用いて pPBbsr2-MCS の XhoI サイトに挿入することで pPBbsr2-AKT-KTR(nTurquoise2)を作製した。

(31) pPBbsr2-EA の作製

pHGEA に対して P34 と P38 を用いて PCR を行い、DNA 断片-3 を調製した。また、pCSIIbleo-Akt-FoxO3a-KTR_S294/S315/S344A-nTurquoise2 (表 2, No.9) に対して P39 と P40 を用いて PCR を行い、DNA 断片-4 を調製した。DNA 断片-3 と DNA 断片-4 を In-fusion HD Cloning Kit を用いて pPBbsr2-MCS (表 2, No.8) の XhoI サイトに挿入することで pPBbsr2-EA を作製した。

*EA = ERK-KTR(mKO)-p2A-AKT-KTR(nTurquoise2)

(32) pPBbsr2-ERK-KTR(mCherry)の作製

pPBbsr2-EA に対して P34 と P41 を用いて PCR を行い、DNA 断片-5 を調製した。また、pmCherry-C1 に対して P42 と P37 を用いて PCR を行い、DNA 断片-6 を調製した。DNA 断片-5 と DNA 断片-6 を In-fusion HD Cloning Kit を用いて pPBbsr2-MCS (表 2, No.8) の XhoI サイトに挿入することで pPBbsr2-ERK-KTR(mCherry)を作製した。

4.5.5 細胞培養条件

HeLa 細胞は、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン、10% 非働化ウシ胎児血清を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)を用いて、5% CO₂、37°Cで培養した。局在性リガンド化合物添加を行う際は、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシンを含み、フェノールレッドと血清を含まない DMEM (DMEM_i)を使用した。

4.5.6 恒常発現細胞の樹立

全ての恒常発現細胞は、*piggyBac* transposon vector system を用いて調製した^[4-19]。手順の次に記した。HeLa 細胞を 2 枚の 40 mm ディッシュに 2.0×10^5 cells/mL で播種し、5% CO₂、37°Cで 24 h 培養した。その後、ペニシリン/ストレプトマイシン不含有、10%非働化ウシ胎児血清含有 DMEM (DMEM_i)を用いて細胞を 2 回洗浄し、1.5 mL DMEM_iに置換した。250 µL Opti-MEM に donor vector と transposase vector (mPB, 表 2, No.11)を添加し 5 min 静置した溶液と 250 µL Opti-MEM に 20 µg Polyethyleneimine “MAX” (Polysciences, Inc)を添加し 5 min 静置した溶液を混和し、さらに 20 min 静置した溶液を細胞に添加し 5% CO₂、37°Cで 1-2 日間培養した* (総容量 2 mL)。その後、培地を DMEM に置換し抗生物質を添加し 5% CO₂、37°Cで静置しセレクションを行った (2 µg/mL ピューロマイシン (Sigma, P8833)、10 µg/mL ブラストサイジン S (Wako, 029-18701))。2-4 日毎にセレクション用の DMEM を置換し、培養スケールを 10 cm ディッシュまで上げることで恒常発現細胞を樹立した。特にシングルセルクローニングは行わず、以降の細胞実験に使用した。樹立した恒常発現細胞の一覧を表 5 に示した。

*donor vector が 1 種類: 2.85 µg donor vector, 1.15 µg mPB,

donor vector が 2 種類: 1.66 µg donor vector-1, 1.66 µg donor vector-2, 0.67 µg mPB

表 5 *piggyBac* transposon vector system を用いて樹立した細胞株と
樹立時に使用したプラスミド (donor vector) の一覧

No.	恒常発現タンパク質 [HeLa細胞]	Donor vector -1	Donor vector -2
1	eDHFR-GFP	pPBpuro-eDHFR-GFP	—
2	SNAP-GFP	pPBpuro-SNAP-GFP	—
3	K6-SNAP-GFP	pPBpuro-K6-SNAP-GFP	—
4	K6-eDHFR-GFP	pPBpuro-SNAP-GFP	—
5	K6sp-eDHFR-GFP	pPBpuro-SNAP-GFP	—
6	K6-SNAP-GFP-RasGRF1(Cdc25), ERK-KTR(mCherry)	pPBpuro-SNAP-GFP-RasGRF1(Cdc25)	pPBbsr2-ERK-KTR(mCherry)
7	K6-SNAP-GFP, ERK-KTR(mCherry)	pPBpuro-SNAP-GFP-RasGRF1(Cdc25)	pPBbsr2-ERK-KTR(mCherry)
8	K6sp-eDHFR-GFP-iSH, AKT-KTR(nTurquoise2)	pPBpuro-K6sp-eDHFR-GFP-iSH	pPBbsr2-AKT-KTR(nTurquoise2)
9	K6sp-eDHFR-GFP, AKT-KTR(nTurquoise2)	pPBpuro-K6sp-eDHFR-GFP	pPBbsr2-AKT-KTR(nTurquoise2)
10	ERK-KTR(mKO), AKT-KTR(nTurquoise2)	pPBbsr2-EA	—
11	K6sp-eDHFR-GFP-iSH, ERK-KTR(mKO), AKT-KTR(nTurquoise2)	pPBpuro-K6sp-eDHFR-GFP-iSH	pPBbsr2-EA
12	K6-SNAP-EGFP-RasGRF1(Cdc25), K6sp-eDHFR-miRFP703-iSH, ERK-KTR(mKO), AKT-KTR(nTurquoise2)	pPBpuro-SG	pPBbsr2-EA

4.5.7 Western blot による SNAP タグと局在性 BCP リガンドの結合評価

コラーゲン I-C (新田ゼラチン) を用いて 40 mm ディッシュ (TPP, Cat. No. 93040) をコラーゲンコートし、SNAP-GFP/K6-SNAP-GFP 恒常発現 HeLa 細胞と HeLa 細胞を 2.0×10^5 cells 播種し、5% CO₂, 37°C で 24 h 培養した^[4-20]。その後、細胞を DMEMi で 2 回洗浄し 2 mL DMEMi に置換し、下記の(i)-(viii)に記す条件で細胞を処理した。次に、細胞を 4°C で冷却した Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) 1 mL で細胞を 2 回洗浄し、Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo Fisher Scientific) を添加した 300 μ L RIPA buffer [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.5% デオキシコール酸ナトリウム, 0.1% SDS, 1.0% ノニデット P-40]を細胞に添加し、氷上 (4°C) で細胞溶解液を調製した。回収した細胞溶解液の遠心分離 (21,500 x g, 10 min, 4°C) を行い、上澄み 250 μ L を回収した。この上澄みに 2x SDS-PAGE サンプルバッファー [0.1 M Tris-HCl (pH 6.8), 4% SDS, 12% 2-メルカプトエタノール (2ME), 20% グリセロール, 0.02% ブロモフェノールブルー]を 250 μ L 添加し、転倒混和しスピダウンした後、95°C で 5 min 静置した。SDS-PAGE (10% 分離ゲル/4% 濃縮ゲル, 200 V, 50 min) を行った後、ニトロセルロース膜に転写した (100 V, 60 min) (Bio-Rad Laboratories)。その後、5%スキムミルクを添加した 0.1% Tween-20 含有 Tris 緩衝液 (TBST) でブロッキングを行い、TBST で洗浄した後、anti-GFP rabbit pAb (632592, Clontech) と anti-GAPDH rabbit mAb (14C10, CST) を用いた一次抗体反応を行った。TBST による洗浄の後、anti-rabbit IgG, HRP linked antibody (7074, CST) を用いた二次抗体反応を行った。TBST による洗浄の後、SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific) と ChemiDoc MP system (Bio-Rad Laboratories) を用いてシグナルを検出することで、図 62a, b を得た。

(i) **mgcBCP** (化合物 8) 添加:

1 mL DMEMi に 3 μ L 10 mM **mgcBCP** (DMSO ストック溶液) を懸濁後、細胞に添加し 5% CO₂, 37°C で静置した (総容量 3 mL, 10 μ M **mgcBCP**) (SNAP-GFP, 60 min; K6-SNAP-GFP, 30 min)。

(ii) 化合物 **6, 7, 9** 添加:

1 mL DMEMi に 3 μ L 10 mM **6, 7, 8** (DMSO ストック溶液) をそれぞれ懸濁後、細胞に添加し 5% CO₂, 37°C で静置した (総容量 3 mL, 10 μ M **6, 7, 8**) (SNAP-GFP, 60 min)。

(iii) Vehicle (DMSO 0.1%):

1 mL DMEMi に 3 μ L DMSO を懸濁後、細胞に添加し 5% CO₂, 37°C で静置した (総容量 3 mL, 0.1% DMSO (v/v)) (SNAP-GFP, 60 min; K6-SNAP-GFP, 30 min)。

(iv) **mgcBCP** + free-BCP 添加:

ディッシュ中の DMEMi 1 mL を回収し、そこに 2 μ L free-BCP (10 mM DMSO 溶液)を懸濁後、細胞に添加し 5% CO₂, 37°C で静置した (総容量 2 mL, 10 μ M free-BCP) (SNAP-GFP/K6-SNAP-GFP, 40 min)。細胞を 1 mL DMEMi で洗浄後 2 mL DMEMi に浸した。1 mL DMEMi に 3 μ L **mgcBCP** を懸濁後、細胞に添加し 5% CO₂, 37°C で静置した (SNAP-GFP, 60 min; K6-SNAP-GFP, 30 min)。

(v) **mBCP** 添加:

1 mL DMEM_i に 3 μ L 10 mM **mBCP** (DMSO ストック溶液) を懸濁後、細胞に添加し 5% CO₂、37°C で静置した (総容量 3 mL, 10 μ M **mBCP**) (SNAP-GFP, 60 min; K6-SNAP-GFP, 30 min)。

(vii) **mgcBCP** + 2BP 添加:

培地を 1 mL DMEM に置換し、1 mL DMEM に 2 μ L 2-bromopalmitate (2-BP, 100 mM DMSO ストック溶液) を懸濁後、細胞に添加し 5% CO₂、37°C で静置した (総容量 2 mL, 100 μ M 2-BP) (SNAP-GFP, 3.5 h; K6-SNAP-GFP, 6.0 h)。細胞を 1 mL DMEM_i で洗浄後 2 mL DMEM_i に浸した。1 mL DMEM_i に 3 μ L **mgcBCP** を懸濁後、細胞に添加し 5% CO₂、37°C で静置した (SNAP-GFP, 60 min; K6-SNAP-GFP, 30 min)。

(viii) intact HeLa 細胞:

特に処理は行わず次に進んだ。

4.5.8 共焦点レーザー顕微鏡観察時の細胞播種条件

細胞 (2.0 $\times 10^5$ cells) を 35 mm ガラス底ディッシュ (12 ϕ) に播種し、5% CO₂、37°C で 18-24 h 培養した後に観察を行った。必要に応じて、ガラス底ディッシュをコラーゲン I-C (新田ゼラチン) をコートした^[4-20]。観察は、Olympus IX81-ZDC/FV1000 共焦点レーザー顕微鏡 (60x 1.42 NA PlanApo oil immersion objective) と Zeiss LSM880 共焦点レーザー顕微鏡 (63x 1.4 NA PlanApo oil objective) を用いて行った。タイムラプスイメージングは、ステージ温度を 37°C に設定して実施した。取得した蛍光像の解析は、ImageJ (National Institute of Health) を用いて行った。

4.5.9 eDHFR-GFP、K6-eDHFR-GFP、K6sp-eDHFR-GFP の局在移行誘導

表題のタンパク質を恒常発現する HeLa 細胞を 24-30 h 培養した後、培地を 2 mL DMEM_i に置換した。その後、ディッシュを共焦点レーザー顕微鏡のステージに設置しタイムラプスイメージングを開始した (1 frame/1 min)。観察から 5 min 経時点で、3 μ L 10 mM **mgcTMP** (DMSO ストック溶液) を 1 mL DMEM_i で懸濁後に細胞へ添加し、蛍光像の経時変化を取得した (総容量 3 mL, 10 μ M **mgcTMP**)。

4.5.10 局在性 BCP リガンド (化合物 **6**, **7**, **mgcBCP (8)**, **9**) を用いた SNAP-GFP の局在移行誘導

コラーゲンコートしたガラス底ディッシュで SNAP-GFP 恒常発現 HeLa 細胞を 24-30 h 培養した。培地を 2 mL DMEM_i に置換し直ぐに共焦点レーザー顕微鏡で蛍光像を取得した (添加前)。そのディッシュに、3 μ L 10 mM **6**, **7**, **mgcBCP (8)**, **9** (DMSO ストック溶液) を 1 mL DMEM_i で懸濁後に細胞へ添加し (総容量 3 mL, 10 μ M **6**, **7**, **mgcBCP (8)**, **9**)、5% CO₂、37°C で 60 min 静置した。その後、再度観察を行うことで蛍光像 (添加後) を取得した。

4.5.11 局在性 BCP リガンド（化合物 6）とゴルジ体マーカーの共染色

HeLa 細胞を 24-30 h 培養した後、培地を DMEM_i に置換し、pSNAP-mCherry と pAcGFP1-Golgi (Clontech)、Lipofectamine LTX (Life technologies) を用いてトランスフェクションを行い、HeLa 細胞に SNAP-mCherry と GFP-GalT を共発現させた。培地を 2 mL DMEM_i に置換し直ぐに共焦点レーザー顕微鏡で蛍光像を取得した（添加前）。そのディッシュに、3 μ L 10 mM 6（DMSO ストック溶液）を 1 mL DMEM_i で懸濁後に細胞へ添加し（総容量 3 mL, 10 μ M 6）、5% CO₂、37°C で 60 min 静置した。その後、再度観察を行うことで蛍光像（添加後）を取得した。

4.5.12 mgcBCP, mgcAc, mBCP, mgaBCP, mgsBCP を用いた SNAP-GFP、K6-SNAP-GFP の局在移行誘導

コラーゲンコートしたガラス底ディッシュで SNAP-GFP あるいは K6-SNAP-GFP を恒常発現する HeLa 細胞を 24-30 h 培養した後、培地を 2 mL DMEM_i に置換した。その後、ディッシュを共焦点レーザー顕微鏡のステージに設置しタイムラプスイメージングを開始した（1 frame/1 min）。観察から 5 min 経時点で、3 μ L 10 mM mgcBCP, mgcAc, mBCP, mgaBCP, mgsBCP（DMSO ストック溶液）をそれぞれ 1 mL DMEM_i に懸濁し、細胞へ添加後の蛍光像の経時変化を取得した（総容量 3 mL, 10 μ M mgcBCP, mgcAc, mBCP, mgaBCP, mgsBCP）。

4.5.13 free-BCP 添加による SNAP-GFP、K6-SNAP-GFP の局在移行阻害

コラーゲンコートしたガラス底ディッシュで SNAP-GFP あるいは K6-SNAP-GFP を恒常発現する HeLa 細胞を 24-30 h 培養した後、培地を 1 mL DMEM_i に置換した。1 mL DMEM_i に 2 μ L 10 mM free-BCP を添加し、5% CO₂、37°C で 40 min 静置した。1 mL DMEM_i で洗浄して培地を 2 mL DMEM_i に置換し、タイムラプスイメージングを開始した（1 frame/1 min）。観察から 5 min 経過時点で、3 μ L 10 mM mgcBCP（DMSO ストック溶液）を 1 mL DMEM_i に懸濁した後に細胞へ添加し、蛍光像の経時変化を取得した（総容量 3 mL, 10 μ M mgcBCP）。

4.5.14 2-BP 処理時の SNAP-GFP、K6-SNAP-GFP の局在移行誘導

コラーゲンコートしたガラス底ディッシュで SNAP-GFP あるいは K6-SNAP-GFP を恒常発現する HeLa 細胞を 24-30 h 培養した後、培地を新しい DMEM 1 mL に置換した。2 μ L 100 mM 2-BP を 1 mL DMEM で懸濁後に細胞へ添加し、5% CO₂、37°C で 3.5 h（SNAP-GFP）or 6.0 h（K6-SNAP-GFP）静置した。その後、1 mL DMEM_i で洗浄して培地を 2 mL DMEM_i に置換し、タイムラプスイメージングを開始した（1 frame/1 min）。観察から 5 min 経過時点で、1 mL DMEM_i に 3 μ L 10 mM mgcBCP（DMSO ストック溶液）を懸濁した後に細胞へ添加し、蛍光像の経時変化を取得した（総容量 3 mL, 10 μ M mgcBCP）。

4.5.15 K6-SNAP-GFP の iPM 局在化の持続時間評価

コラーゲンコートしたガラス底ディッシュで K6-SNAP-GFP 恒常発現 HeLa 細胞を 24-30 h 培養した。培地を 2 mL DMEM_i に置換し直ぐに共焦点レーザー顕微鏡で蛍光像を取得した（添加前）。そのディッシュに、3 μ L 10 mM **mgcBCP**（DMSO ストック溶液）を 1 mL DMEM_i で懸濁後に細胞へ添加し（総容量 3 mL, 10 μ M **mgcBCP**）、5% CO₂、37°C で 0.5 h 静置した。その後、再度観察を行うことで蛍光像（0.5 h 時点）を取得した後に、培地を DMEM に置換しさらに培養を続け、6, 12, 24 h 経過時点において蛍光像を取得した。

4.5.16 K6-SNAP-RasGEF の iPM 局在移行誘導に伴う Ras/ERK 経路の人工活性化

コラーゲンコートしたガラス底ディッシュで K6-SNAP-GFP-RasGRF1(Cdc25) と ERK-KTR(mCherry)を恒常共発現する HeLa 細胞、あるいは K6-SNAP-GFP と ERK-KTR(mCherry)を恒常共発現する HeLa 細胞を 24-30 h 培養した。2 mL DMEM_i に置換し、5% CO₂、37°C で 5-7 h 静置し、細胞を血清飢餓状態にした。MEK 阻害剤処理時は、MEK 阻害剤を添加し（50 μ M PD98059, CST）5% CO₂、37°C で更に 90 min 静置した。その後、ディッシュを共焦点レーザー顕微鏡のステージに設置しタイムラプスイメージングを開始した（1 frame/1 min）。観察から 5 min 経時点で、3 μ L 10 mM **mgcBCP**（DMSO ストック溶液）を 1 mL DMEM_i に懸濁し、細胞へ添加後の蛍光像の経時変化を取得した（総容量 3 mL, 10 μ M **mgcBCP**）。

4.5.17 K6sp-eDHFR-iSH の iPM 局在移行誘導に伴う PI3K/Akt 経路の人工活性化

K6sp-eDHFR-GFP-iSH と AKT-KTR(nTurquoise2)を恒常共発現する HeLa 細胞、あるいは K6sp-eDHFR-GFP と AKT-KTR(nTurquoise2)を恒常共発現する HeLa 細胞を 24-30 h 培養した。2 mL DMEM_i に置換し、5% CO₂、37°C で 5-7 h 静置し、細胞を血清飢餓状態にした。Akt 阻害剤処理時は、Akt 阻害剤を添加し（20 μ M AZD5363, Cayman Chemical）5% CO₂、37°C で更に 30 min 静置した。その後、ディッシュを共焦点レーザー顕微鏡のステージに設置しタイムラプスイメージングを開始した（1 frame/1 min）。観察から 5 min 経時点で、3 μ L 10 mM **mgcTMP**（DMSO ストック溶液）を 1 mL DMEM_i に懸濁し、細胞へ添加後の蛍光像の経時変化を取得した（総容量 3 mL, 10 μ M **mgcTMP**）。

4.5.18 K6-SNAP-GFP と K6sp-eDHFR-GFP の iPM 局在移行の独立制御

K6sp-eDHFR-GFP を恒常共発現する HeLa 細胞を 24-30 h 培養した。培地を DMEM_i に置換し、pK6-SNAP-mCherry と Polyethyleneimine “MAX”を用いてトランスフェクションを行い、HeLa 細胞に K6-SNAP-mCherry を共発現させた。2 mL DMEM_i に置換し、ディッシュを共焦点レーザー顕微鏡のステージに設置しタイムラプスイメージングを開始した（1 frame/1 min）。観察から 5

min 経時点で、3 μ L 10 mM **mgcBCP** (DMSO ストック溶液) を 1 mL DMEM_i に懸濁し、細胞へ添加後の蛍光像の経時変化を取得した (総容量 3 mL, 10 μ M **mgcBCP**)。さらに 23 min 時点でディッシュから培地を 1 mL 回収した。そこに 3 μ L 10 mM **mgcTMP** を添加し懸濁後に 25 min 時点で細胞へ添加し (総容量 3 mL, 10 μ M **mgcBCP**, 10 μ M **mgcTMP**)、蛍光像の経時変化を更に取得した。

4.5.19 Ras/ERK 経路と PI3K/Akt 経路の独立活性化制御

K6-SNAP-EGFP-RasGRF1(Cdc25), K6sp-eDHFR-miRFP703-iSH, ERK-KTR(mKO), AKT-KTR(nTurquoise2)を恒常共発現する HeLa 細胞を 24-30 h 培養した。その後、培地を 1 mL 回収し 2 μ L 25 mM biliverdin (DMSO stock 溶液) と 5 μ L Pluronic F-127 を予め混合したものを回収した培地で懸濁し細胞へ添加し 5% CO₂、37°C で 12 h 静置した (25 μ M biliverdin, 0.03% Pluronic F-127) [4-21]。その後、1 mL DMEM_i で細胞を洗浄し、2 mL DMEM_i に置換した。ディッシュを共焦点レーザー顕微鏡のステージに設置しタイムラプスイメージング (4 色イメージング) を開始した (1 frame/2 min)。観察から 5 min 経時点で、3 μ L 10 mM **mgcBCP** (DMSO ストック溶液) を 1 mL DMEM_i に懸濁し、細胞へ添加後の蛍光像の経時変化を取得した (総容量 3 mL, 10 μ M **mgcBCP**)。さらに 27 min 時点でディッシュから培地を 1 mL 回収した。そこに 3 μ L 10 mM **mgcTMP** を添加し懸濁後に 30 min 時点で細胞へ添加し (総容量 3 mL, 10 μ M **mgcBCP**, 10 μ M **mgcTMP**)、蛍光像の経時変化を更に取得した。

4.5.20 Ras/ERK 経路活性化に伴う Akt の活性解析

ERK-KTR(mKO), AKT-KTR(nTurquoise2)を恒常共発現する HeLa 細胞を 24-30 h 培養した。培地を DMEM_i に置換し、pPBpuro-K6-SNAP-EGFP-RasGRF1(Cdc25)と Polyethyleneimine “MAX”を用いてトランスフェクションを行い、HeLa 細胞に K6-SNAP-EGFP-RasGRF1(Cdc25)を共発現させた。その後、1 mL DMEM_i で細胞を洗浄し、2 mL DMEM_i に置換した。ディッシュを共焦点レーザー顕微鏡のステージに設置しタイムラプスイメージング (3 色イメージング) を開始した (1 frame/2 min)。観察から 5 min 経時点で、3 μ L 10 mM **mgcBCP** (DMSO ストック溶液) を 1 mL DMEM_i に懸濁し、細胞へ添加後の蛍光像の経時変化を取得した (総容量 3 mL, 10 μ M **mgcBCP**)。さらに 27 min 時点でディッシュから培地を 1 mL 回収した。そこに 3 μ L 10 mM **mgcTMP** を添加し懸濁後に 30 min 時点で細胞へ添加し (総容量 3 mL, 10 μ M **mgcBCP**, 10 μ M **mgcTMP**)、蛍光像の経時変化を更に取得した。

4.5.21 PI3K/Akt 経路活性化に伴う ERK の活性解析

K6-eDHFR-EGFP-iSH, ERK-KTR(mKO), AKT-KTR(nTurquoise2)を恒常共発現する HeLa 細胞を 24-30 h 培養した。その後、1 mL DMEM_i で細胞を洗浄し、2 mL DMEM_i に置換した。ディッシュを共焦点レーザー顕微鏡のステージに設置しタイムラプスイメージング (3 色イメージング) を開始した (1 frame/2 min)。観察から 5 min 経時点で、3 μ L 10 mM **mgcBCP** (DMSO ストック溶液) を 1 mL DMEM_i に懸濁し、細胞へ添加後の蛍光像の経時変化を取得した (総容量 3 mL, 10 μ M **mgcBCP**)。さらに 27 min 時点でディッシュから培地を 1 mL 回収した。そこに 3 μ L 10 mM **mgcTMP** を添加し懸濁後に 30 min 時点で細胞へ添加し (総容量 3 mL, 10 μ M **mgcBCP**, 10 μ M **mgcTMP**)、蛍光像の経時変化を更に取得した。

4.6 参考文献

- [4-1] (a) Murphy L.O. and Blenis J., *Trends Biochem. Sci.* **31**, 268 (2006), (b) Katz M. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **1773**, 1161 (2007), (c) Huang Y. and Chang Y., *Prostate Cancer - From Bench to Bedside*, InTech, ch. 8, (2011)
- [4-2] (a) Lim W., Mayer B., Pawson T., *Cell Signaling: principles and mechanisms*, Garland Science, 1st edn, ch. 5, (2014), (b) Kholodenko B.N. *et al.*, *Trends Cell Biol.* **10**, 173 (2000), (c) Schlessinger J., *Cell* **103**, 211 (2000)
- [4-3] (a) Mendoza M.C. *et al.*, *Trends Biochem. Sci.* **36**, 320 (2011), (b) Fey D. *et al.*, *Front. Physiol.* **3**, 355 (2012), (c) Schneider G. *et al.*, *Nat. Rev. Cancer* **17**, 239 (2017), (d) Kolch W. *et al.*, *Nat. Rev. Cancer* **15**, 515 (2015)
- [4-4] Miller L.W. *et al.*, *Nat. Methods* **2**, 255 (2005)
- [4-5] (a) Creaser S. and Peterson B.R., *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 2444 (2002), (b) Schroeder H. *et al.*, *J. Cell Biol.* **134**, 647 (1996), (c) Okada M., *Int. J. Biol. Sci.* **8**, 1385 (2012), (d) Salaun C. *et al.*, *J. Cell Biol.* **191**, 1229 (2010), (e) Fivaz M. and Meyer T., *Neuron* **40**, 319 (2003)
- [4-6] (a) Gureasko J. *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 452 (2008), (b) Aoki K. *et al.*, *Sci. Rep.* **3**, 1541 (2013), (c) Freedman T.S. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 16692 (2006)
- [4-7] (a) Heo W.D. *et al.*, *Science* **314**, 1458 (2006), (b) Hancock J. F., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 373 (2003)
- [4-8] (a) Goldenberg N.M. and Steinberg B.E., *Cancer Res.* **70**, 1277 (2010), (b) McLaughlin S. and Aderem A., *Trends Biochem. Sci.* **20**, 272 (1995)
- [4-9] Regot S. *et al.*, *Cell* **157**, 1724 (2014)
- [4-10] (a) Klippel A. *et al.*, *Mol. Cell Biol.* **13**, 5560 (1993), (b) Suh B.-C. *et al.*, *Science* **314**, 1454 (2006)
- [4-11] Maryu G. *et al.*, *Cell Struct. Funct.* **41**, 81 (2016)
- [4-12] *nTurquoise2*: Goedhart J. *et al.*, *Nat. Commun.* **3**, 751 (2012)
- [4-13] *mKO1*: Karasawa S. *et al.*, *Biochem. J.* **381**, 307 (2004)
- [4-14] *miRFP703*: (a) Shcherbakova D.M. *et al.*, *Nat. Commun.* **7**, 12405 (2016), (b) Shemetov A.A. *et al.*, *Cell Chem. Biol.* **24**, 1 (2017)
- [4-15] (a) Aksamitiene E. *et al.*, *Cell Signal.* **23**, 1794 (2011), (b) Fujita Y. *et al.*, *FEBS J.* **281**, 3177 (2014)
- [4-16] Rastogi K. *et al.*, *J. Med. Chem.* **45**, 4485 (2002)
- [4-17] Kaiser E. *et al.*, *Anal. Biochem.* **34**, 595 (1970)
- [4-18] (a) Szymczak, A.L. *et al.*, *Nat. Biotechnol.* **2**, 589 (2004), (b) Kim J.H. *et al.*, *PLoS One* **6**, e18556 (2011), (c) Liu Z. *et al.*, *Sci. Rep.* **7**, 2193 (2017)
- [4-19] Yusa K. *et al.*, *Nat. Methods* **6**, 363 (2009)
- [4-20] Aoki K. and Matsuda M., *Nat. Protoc.* **4**, 1623 (2009)
- [4-21] *miRFP703* の発色団である biliverdin は、細胞内で生合成されるものの biliverdin reductase

(BVR) により bilirubin に変換される。これが原因となり miRFP703 の蛍光強度と S/N ratio の低下を招く。その対策として Shemetov らは、細胞培養液への biliverdin の添加で miRFP703 の蛍光強度が増大することを報告している。

(a) Shemetov A.A. *et al.*, *Cell Chem. Biol.* **24**, 1 (2017), (b) Uda Y. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2017), early-edition, doi:10.1073/pnas.1707190114, (c) Terry M.J. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **268**, 26099 (1993), (d) Park J.S. *et al.*, *ACS Chem. Biol.* **11**, 2177 (2016)

第五章 結言

第一章では、従来の小分子蛍光プローブ・合成小分子化合物の現状とそれらを用いた細胞機能の解析・制御技術の問題点を整理し、細胞内の局所領域に選択的に集積する（局在化する）蛍光プローブやリガンド化合物の重要性を背景とした本研究の目的について述べた。

第二章では、化合物局在化のための分子設計戦略が確立されていない重要性の高い細胞内領域として細胞核内を標的とし、さまざまな小分子蛍光プローブに核局在性を付与するための汎用的なアプローチとして Hoechst 連結法を開発した。この Hoechst 連結法を骨格や光化学特性の異なる蛍光色素に適用することで開発した Hoechst 連結蛍光プローブは、いずれも生細胞において明確な核局在化を示した。さらに、Hoechst 連結蛍光プローブは、さまざまな細胞株や非固定のラット海馬スライスにおいても明確な核局在化を示し、核蛍光染色剤として利用できることを明らかにした。以上より、Hoechst 連結法が、蛍光プローブに核局在性を付与するための汎用的な分子設計戦略となることを実証した。

第三章では、第二章において開発した核局在性 fluorescein (**hoeFL**) を構成する Hoechst と fluorescein が pH 感受性の蛍光プローブであることに着目し、両蛍光プローブの蛍光強度比変化に基づく、核内選択的な pH 測定技術を開発した。本技術を用いることで、生きた HeLa 細胞の核内選択的な pH 測定に成功した。生細胞の核内選択的な pH 測定を化合物単独で達成した例は、本成果が初である。本成果は、生細胞の核内 pH を領域特異的に可視化するための基盤技術となり、核内 pH の制御機構を調べるための解析ツールとしての応用が期待できる。

第四章では、細胞内膜 (iPM) に自発的に局在化するリガンド化合物 (iPM 局在性リガンド) を開発した。リガンド化合物として eDHFR タグの基質である trimethoprim (TMP) を選択し、iPM 局在性化合物 (mgc タグ) を連結することで、iPM 局在性 TMP リガンド (**mgcTMP**) を開発した。**mgcTMP** は、細胞に発現させた eDHFR の iPM (と一部ゴルジ体) への局在移行を誘導し、eDHFR を iPM へ繫留することに成功した。また、この eDHFR に Ras/ERK 経路の活性化因子である RasGEF を融合し、iPM 局在化を **mgcTMP** で誘導することで、RasGEF の iPM 局在化を起点とした Ras/ERK 経路の人工活性化に成功した。さらに、**mgcTMP**/eDHFR と直交性を有する第 2 のシステムとして、**mgcBCP**/SNAP システムを開発した。SNAP タグをそのまま細胞に発現させ **mgcBCP** を添加すると、SNAP タグは iPM ではなくゴルジ体に局在化したが、SNAP タグの N 末端側にカチオン性アミノ酸であるリジンを導入することで iPM 選択的な局在移行誘導を達成することに成功した。さらに、リジンを eDHFR の N 末端に導入することで、eDHFR の局在移行を iPM 選択的に誘導することに成功した。これらの結果は、タンパク質の末端部位への正電荷の導入が、タンパク質の局在移行誘導時の iPM 選択性を高めるための汎用的な分子設

計戦略になることを示す重要な知見であると考えられる。本章において開発した **mgeTMP/eDHFR** と **mgeBCP/SNAP** は直交性を有しており、これらを併用することで、単一細胞内で 2 種類のタンパク質の **iPM** 局在化を独立に制御することに成功した。本システムを用いることでタンパク質の **iPM** 局在化を起点に活性化する 2 種類のシグナル伝達経路 (**Ras/ERK** 経路、**PI3K/Akt** 経路) を任意のタイミングで独立に制御可能なシグナル制御システムの新規開発に成功した。さらに 1 細胞 2 分子制御システムを用いたシグナル制御と、蛍光タンパク質プローブを用いた 1 細胞 4 色イメージングを行うことで、2 つのシグナル伝達経路間のクロストークをリアルタイムに可視化・解析することに成功した。1 細胞 4 色イメージングにより、2 種類タンパク質の局在移行とそれによる 2 種類のシグナル活性化を同時に可視化・解析した例は、本成果が世界初である。

以上の内容を総括すると、本研究では、核内と **iPM** に自発的に局在化する化合物を開発するための分子設計基盤を確立した。さらに、本技術を用いることで細胞内の分子プロセスの可視化・センシング・制御を核内と **iPM** 選択的に行うための応用技術の開発に成功した。今後の展望として、第二章・第三章で開発した **Hoechst** 連結法は、既存のさまざまな蛍光色素・蛍光センサーに適用することで、さまざまな金属イオンなどのセカンドメッセンジャーの核内選択的な可視化・センシング・解析を行うための核局在性蛍光プローブを創製する強力なアプローチとしての応用展開が期待できる。また、核局在性蛍光プローブを用いた核内分子プロセスの可視化技術を第四章で開発した 1 細胞 2 分子制御技術と組合せることで、**iPM** から核内へと伝搬する複数の細胞内シグナルにより制御される細胞機能を精密に解析・制御するための基盤技術としての応用が期待できる。本技術が細胞機能の解明を進める助けとなれば、筆者にとってこれ以上の喜びはない。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始懇切丁寧な御指導および御鞭撻賜り、私に化学・生物学という学問の魅力を教えて頂いた名古屋工業大学大学院 生命・応用化学専攻 築地 真也 教授に心より感謝の意を表します。

本論文の執筆にあたり、有益な御教示・御助言を頂きました名古屋工業大学大学院 生命・応用化学専攻 樋口 真弘 教授、出羽 毅久 教授、井上 圭一 准教授に深く感謝致します。

学部から修士課程の三年間、長岡技術科学大学 極限エネルギー密度工学研究センターにおいて、終始懇切丁寧な御指導を賜りました長岡技術科学大学大学院 工学研究科 中山 忠親 教授に心より感謝の意を表します。

共焦点レーザー顕微鏡による4色イメージング実験にあたり、さまざまな便宜を図って下さいました京都大学大学院 生命科学研究科 松田 道行 教授、岡崎統合バイオサイエンスセンター 基礎生物学研究所 青木 一洋 教授に深く感謝致します。

本研究を遂行するに当たり化合物の HRMS 解析を行って頂いた名古屋大学 ITbM 分子構造センター 桑田 啓子 特任助教に深く感謝致します。

本研究を遂行するに当たり DNA シーケンサーを使用する際に便宜を図って下さいました名古屋工業大学大学院 生命・応用化学専攻 神取 秀樹 教授、神取研究室 吉住 玲 博士に深く感謝致します。

本研究を行う上で多くの場面で御指導頂き、時に優しく時に厳しく励まして頂きました築地研究室 吉井 達之 助教に深く感謝致します。

築地研究室配属当初、直接御指導頂いた 石田 学 博士（現 富士化学工業株式会社）に深く感謝致します。また、本研究の一部を共に行った築地研究室 沖 超二 氏、滝川 和正 氏、渡部 秀章 氏、澤田 隼佑 氏、藤沼 学子 氏に深く感謝の意を表します。

研究室において温かい助言を頂いた、築地研究室の皆様へ深く感謝致します。

本研究に際し多くの面でご協力頂きました名古屋工業大学大学院 工学研究科 事務職員の皆様に感謝致します。

大学における長い研究期間を一言の文句もなく支援して下さいました父母に心より感謝の意を表します。

平成三十年二月 筆者