

財団使用欄

令和6年6月26日 受理
No. 2

完了報告書

(兼 会計報告書)

2024年 6月 24日

公益財団法人 BOMU健康財団
理事長 塩野谷 貫一 殿

個人の方

氏名 花岡 健二郎



団体の方

団体名

代表者



貴財団より助成いただいた活動が完了いたしましたので、下記のとおり報告します。

活動内容	新規蛍光団の創製を基盤とした新たな pH 蛍光プローブの開発
------	--------------------------------

※今後の連絡に必要となりますので、全ての項目にご記入ください。

提出者に関する事項	(フリガナ) 氏名又は団体名	ハナオカ ケンジロウ 花岡 健二郎	生年月日 又は設立年月日	
	(フリガナ) 提出担当者	ハナオカ ケンジロウ 花岡 健二郎		
	住所			
	連絡先 ・ 郵送先	〒105-8512 東京都港区芝公園 1-5-30 慶應義塾大学 薬学部 創薬分析化学講座 (TEL) 03-5400-2684 (FAX) 03-5400-1378 (E-mail) khanaoka@keio.jp		

※提出後の住所・連絡先変更の際は、速やかに事務局までご連絡ください。

(1) 活動成果

細胞内オルガネラは互いに分離され固有の pH 環境を形成しており、生化学反応に対して最適な環境を作り出している。これらオルガネラ内の pH 変化は、細胞内の機能に大きな影響を与えるため、オルガネラ pH の測定は、細胞内で起きている生命現象の理解に極めて重要である。pH の定量にはレシオ型 pH 蛍光プローブが有用であるが、様々なオルガネラでの測定に応用可能な蛍光プローブはなく、汎用性の高い蛍光プローブの開発が求められている。近年、我々グループにて開発されたレシオ型 pH 蛍光プローブである SiRpH 類は、光褪色に強く、GFP などの緑色蛍光タンパク質との共染色が可能であることに加えて、レシオ値変化の pK_a を容易に調節することが可能であった (*J. Am. Chem. Soc.*, 140, 5925-5933 (2018))。しかし一方で、励起波長が汎用されているレーザー光に適合せず汎用性が低いことや、リソソーム内の pH (<5.0) を正確に測定するために、更に低い pK_a を持つ蛍光プローブを開発する必要があるがあった。そこで本研究では、SiRpH 類の分子構造を最適化することで、リソソーム内 pH の測定に適した低い pK_a を持ち、かつ汎用されているレーザー光に適合した励起波長を示す新たな蛍光プローブの開発を行った。

SiRpH 類の励起波長を 20~30 nm 短波長化するために、蛍光団母核を C-rhodamine (CR) 類に代えた CRpH2 を分子設計・合成した。その結果、吸収波長の短波長化に成功し、汎用されているレーザーの波長の 561 nm と 633 nm に最適となった。また、異なる 2 波長で励起した際のレシオ値変化は $pK_a = 5.5$ と算出され、リソソーム内 pH の測定に適していた。次に、開発した CRpH2 をリソソームへと送達するため、エンドサイトーシスによりリソソームへと送達できることが知られている高分子であるデキストラン (Dex) に CRpH2 を標識し、CRpH2-Dex を作成した。そして、リソソームのマーカータンパク質である Tmem192 (EGFP 融合) を安定発現させた MEF 細胞に CRpH2-Dex を導入し生細胞イメージングを行った結果、マーカータンパク質と蛍光プローブの蛍光が高い重なりを示し、リソソーム内の平均 pH は 5.1 と測定された。

(2) 今後の課題

本研究において、CR 類を蛍光色素母核として用いることで、既存のレーザーの波長に適した新たなレシオ型 pH プローブ類の開発に成功した。また、本蛍光プローブ類は、ピペラジン環部位の構造修飾によって容易に pK_a を制御可能であった。しかしながら一方で、細胞内の各オルガネラでの pH 変化を測定することが求められているものの、現状、蛍光プローブをデキストランに結合させることによるリソソーム内への蛍光プローブの送達しか達成できていない。今後の課題として、HaloTag や SNAP-tag テクノロジーなどのタグタンパク質といった遺伝的手法と組み合わせることで、リソソーム以外の様々なオルガネラへと pH 蛍光プローブを送達できる技術の確立を行っていく。また、オルガネラ毎に生理的な pH の範囲も異なっているため、測定するオルガネラに合わせて pH プローブの pK_a の値も調整していく。これら技術の開発を通して、各オルガネラにおける局所 pH を測定していきたい。例えば、初期エンドソーム、後期エンドソーム、ミトコンドリア、核、ER、ゴルジ体、ペルオキシソームなど様々なオルガネラ内の pH の定量を行っていく。最終的には、疾患細胞での細胞内局所での pH 測定を行うことを通して、疾患と pH の関係を明らかにし、疾患メカニズムの解明に貢献していきたい。