



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	2波長による蛍光モニタリングが可能な水溶性蛍光イオンセンサーの分子設計と細胞内イオン濃度のセンシング
Author(s)	神, 隆; 西村, 吾朗; 野村, 保友
Citation	電子科学研究, 1, 37-41
Issue Date	1993
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/24273
Type	departmental bulletin paper
File Information	1_P37-41.pdf



2 波長による蛍光モニタリングが可能な水溶性蛍光イオンセンサーの分子設計と細胞内イオン濃度のセンシング

電子機能素子部門 細胞機能素子研究分野 神 隆
電子機能素子部門 超分子分光研究分野 西村 吾朗
野村 保友

細胞内におけるイオン濃度の分布を画像化するために、蛍光イオンプローブを用いた蛍光顕微分光法が画像処理技術の発展とあいまって近年飛躍的な進歩を遂げている。現在のところ、実用的な細胞内金属イオンに対する蛍光プローブとしては、カルシウムイオンにのみ限られているが、Tsienらの開発したFura-2により、細胞内カルシウムイオン濃度の蛍光測定は、細胞内情報伝達機構の研究にとり必要不可欠な研究手段となってきた。一方、細胞生理学的に極めて重要なアルカリ金属イオンであるナトリウム、カリウムイオンについては、現在のところ数種の蛍光プローブが報告されているが、細胞膜透過性の低さ、測定感度の点での問題があり、実用化まで至っていない。本研究では、細胞内のナトリウム、カリウムイオン濃度を蛍光法より高感度に検出するため、2波長による蛍光モニタリングが可能な蛍光イオンセンサーの分子設計をおこなった。

はじめに

細胞内に存在する各種アルカリ金属イオンのうち、ナトリウムおよびカリウムイオンは代表的な電解質成分であり、哺乳動物の骨格筋細胞内ではナトリウムイオンで約 12 mM、またカリウムイオンでは約 155 mM と高濃度に含まれている。また、細胞内外でのこれらイオンの濃度勾配は、ナトリウムイオンで約 12 倍(細胞外 145 mM)、カリウムイオンで約 40 倍(細胞外 120 mM)あり、これらイオンの濃度勾配が、細胞の形態維持、細胞の電気的活動、細胞膜を介した物質の輸送、細胞内の他のイオン濃度の調整などに関係している。近年、細胞内での情報伝達機構の研究の進展にともない、細胞内におけるナトリウム、カリウムイオン濃度の変化を空間的かつ時間的にモニターできる測定法の開発が望まれている。

生きたままの状態では細胞内のナトリウム、カリウムイオンの濃度を測定する方法としてはこれまで、おもにイオン選択性電極を用いる分析法が使われてきた。この方法は、測定感度の面で優れているが、電極を細胞膜を突き破って細胞内に挿入しなければならないた

め非破壊的な測定法とはいえ、また細胞内でのイオン濃度の空間分布が測定できない欠点をもっている。一方、非破壊的な測定法として近年、ディスプレイウムをシフト試薬として利用する ^{23}Na 、あるいは ^{39}K 核の核磁気共鳴法が、細胞内ナトリウム、カリウムイオン濃度を測定する手段として発展してきているが、この方法も重金属であるシフト試薬を使わなければならないため、生理的条件下での研究には問題があるといえる。最近では、細胞内外でのナトリウム、カリウム核の緩和時間の差を利用することにより、シフト試薬なしでもイオン濃度の測定が可能となってきた。しかしながら、核磁気共鳴法は、測定感度が微小電極法などに比べ著しく低く、臓器の灌流系など比較的感受度の稼げる系では応用可能であるが、細胞一個のレベルでの測定には適さない。近年、核磁気共鳴法を用いた微小空間のイメージング(NMR 顕微鏡)の開発が進められているが、イオン濃度の空間分布を画像化するまでは至っていない。

一方、蛍光法による細胞内イオン濃度の測定法は、1980年にTsienらがカルシウム蛍光プローブ(Fura-2)を開発して以来、急速な発展を見せてきてい

る。現在、細胞内でのカルシウムイオン濃度の測定は、ほとんどが、Fura-2もしくはそれに改良を重ねたカルシウム蛍光プローブを用いておこなわれており、また顕微蛍光分光法の発展とあいまって、細胞内カルシウムイオン濃度の空間分布を画像化できるようになってきている。

しかしながら、細胞内で、最も高濃度に存在するナトリウム、カリウムイオンに対しては、いまだ有効な蛍光プローブは見当たらない。Tsienらは、1989年に、細胞内ナトリウム、カリウムイオンに対する蛍光プローブとしてアザクラウンエーテルの誘導体であるSBFI(ナトリウムイオンプローブ)、PBFI(カリウムイオンプローブ)を発表しているが、これらプローブの蛍光特性として、イオンとの錯形成後、蛍光波長がわずかしきシフトしないという欠点をもっている。そのため、イオンの濃度変化を測定するために、わざわざ2つの異なる波長で励起し、それぞれの発光強度の比をモニターする必要がある、特にイオン濃度の時間変化などをみる場合にはあまり適したプローブとはいえない。この点では、錯形成後、著しい蛍光波長のシフトが起こるようなプローブの方が、2波長で蛍光変化を迫るためイオン濃度の変化を測定する場合有利といえる。また、プローブのイオン選択性の比は、SBFIでカリウムイオンに対して18倍、またPBFIではナトリウムイオンに対して1.5倍の値であり、細胞内のナトリウム、カリウムイオン濃度比を考えると十分な選択性があるとは言えない。

本研究では、従来知られているSBFIやPBFIの欠点を克服し、細胞内ナトリウム、カリウムイオン濃度を高感度に測定するため、2波長での蛍光モニタリングが可能な高感度な蛍光イオンセンサー分子設計をおこなった。細胞内のナトリウム、カリウムイオン濃度を測定するための理想的な蛍光プローブとしての基本的条件は、大きく

- 1) 細胞内に存在する他のイオンの影響が無視できる程度のイオン選択性を持つこと
- 2) イオンとの錯形成において蛍光変化が、強度変化だけではなく、蛍光の色が変わる程度鋭敏であること
- 3) 錯解離定数が測定対象とする細胞内イオン濃度に近い値をもつこと
- 4) 蛍光の量子収率が高く、光分解しにくいこと

- 5) 細胞内へ導入するために十分な膜透過性(疎水性)を持つこと

また、いったん導入後は細胞外に漏れ出さないこと

- 6) 細胞毒性がないこと
などが考えられる。

実用的には、これらすべての条件を満たす蛍光プローブの開発が求められるが、本研究ではとくに1)、2)の条件を満足する分子設計の指針を得るため、いくつかのモデル化合物を合成し、その基本的な蛍光特性を調べた。

2 波長でのモニター可能な 蛍光イオンプローブの分子設計

ナトリウムあるいはカリウムイオンに対する蛍光プローブの条件として、第1に高いイオン選択性をしめす必要がある、これまでは、環状配位子であるクラウンエーテルあるいはクリプタンドを基本骨格とした蛍光イオンプローブの設計が行われてきた。ただし、これら化合物に、蛍光色素を導入するためには基本骨格となっているクラウンエーテルあるいはクリプタンドのイオン結合部位となっている酸素原子を一部窒素原子に置換しなければならなかった。このことは結果的に、ナトリウムあるいはカリウムイオンに対する選択性を減少させることとなる。

この点では、クラウンエーテルあるいはクリプタンド系化合物と同じようなイオン選択性を示す化合物としてカリックスアレンの方が有利である。カリックスアレンはフェノールとアルデヒドと縮合反応から得られる環状オリゴマーであり、そのエステル誘導体は、環径の違いによってイオン半径の異なるアルカリ金属イオンに対してイオン選択性を示すことが知られている。イオン結合部位がエステル部分のカルボニル酸素であるため、蛍光色素はその末端に導入すればよく、クラウンエーテルあるいはクリプタンドを基本骨格とする場合のようにイオン結合部位に手をくわえる必要がない。このことは、イオンの選択性を低下させることなく、蛍光イオンプローブを分子設計することが可能であることを意味する。このような理由から、カリックスアレンを基本骨格とした蛍光イオンプローブの分子設計をおこなった。

蛍光プローブの分子設計で最も重要なのが、どのよ

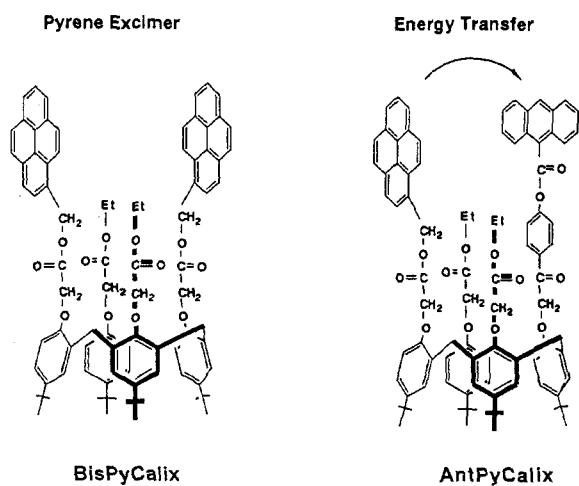


Fig.1 Newly Synthesized Fluorescent Na⁺ Probes

うに蛍光変化をイオンのセンシングと結びつけるかという点である。蛍光変化としては、蛍光強度の変化あるいは蛍光の色の変化(発光波長のシフト)が考えられる。定量的観点から考えると、蛍光強度の変化よりは、蛍光の色の変化が起こるようなプローブが望ましい(2波長での検量が可能)。また蛍光測定では、しばしば励起光による蛍光の退色が起こるため、蛍光強度のみから濃度を見積もると大きな誤差を含むことになる。このことから2波長での蛍光測定は重要である。

以上のような観点から、カリックス[4]アレンを基本骨格として、2波長での蛍光変化が期待できる2種類の蛍光プローブ(図1)を設計し、合成をおこなった。それぞれの化合物、BisPyCalix および AntPyCalix は、ナトリウムとの錯形成後に、ピレンの分子内エキシマーとモノマー蛍光の強度変化あるいはエネルギー移動にともないドナー/アクセプターの蛍光変化が起こるようなプローブとしてデザインした。

合成

BisPyCalix および AntPyCalix の合成は、以下の手順でおこなった。

BisPyCalix: p-tert-Butylcalix[4]arene の Bis-ethoxycarbonylmethyl ether 100mg (0.122 mmol)と 1-Pyrenemethyl iodoacetate 100mg (0.250mmol)を 100 ml の無水テトラヒドロフランに溶かし、さらに 100 mg の無水炭酸カリウムを加える。酸化反応をおさえるため、アルゴン雰囲気下で15時間還流する。冷却後、反応液を0.1 N 塩酸で洗い、有機層を分離する。

精製は、シリカゲルを担体としてカラムクロマトグラフィーによりおこなった。溶出液はクロロホルムとメタノールの20:1混合溶媒を用いた。

AntPyCalix: BisPyCalix 合成と同様な手順により、p-tert-Butylcalix[4]arene の Bis-ethoxycarbonylmethyl ether に対して 1-Pyrenemethyl iodoacetate つづいて p-(9-anthroyloxy)-phenacyl bromide を反応させ合成した。分離精製も BisPyCalix の場合と同様。

それぞれの化合物の同定は、¹H NMR, MS スペクトルおよび元素分析からおこなった。

結果と考察

まず最初に、合成した BisPyCalix および

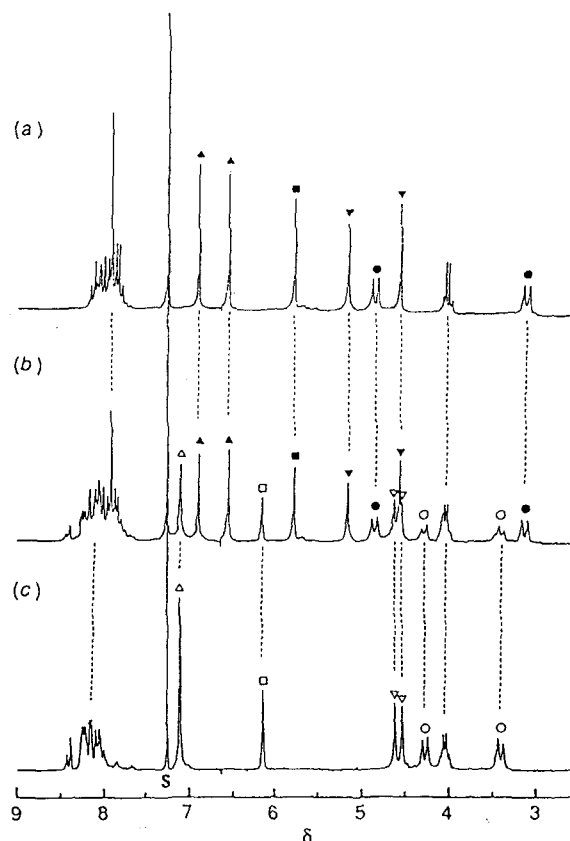


Fig.2 Partial ¹H NMR spectra of the fluorescent BisPyCalix [1] in CDCl₃ at 25°C: (a) R = [NaSCN]/[1] = 0, (b) R = 0.37, (c) R = 1, where [1] = 5.1 mmol dm⁻³. Aliquots from a CD₃OD solution of 1 mol dm⁻³ NaSCN were added directly to a CDCl₃ solution of [1] in a NMR tube. (▲, △ = ArH; ●, ○ = ArCH₂Ar; ▼, ▽ = OCH₂O; ■, □ = pyrene-CH₂) The signal marked S is due to CHCl₃.

AntPyCalix のナトリウムイオンに対する錯形成能を確認するために、チオシアン酸ナトリウムをそれぞれのクロロホルム溶液に添加した時の ^1H NMR スペクトルの変化を調べた。その結果、それぞれの化合物が、ナトリウムイオンと 1:1 の錯体を形成することが明らかとなった。図 2 には、BisPyCalix のクロロホルム溶液にチオシアン酸ナトリウムを添加した時の ^1H NMR スペクトルを示した。フリーの BisPyCalix のクロロホルム溶液中でのコンホメーションは、ベンゼン環を架橋しているメチレン基が AB 型のスペクトルであることから、Cone 構造をとっていることがわかった。また、NOE の測定から、ケミカルシフトの値が 3.14 および 4.88 の吸収は、それぞれ equatorial および axial プロトン対応することが判明している。

ナトリウム塩を添加した時、BisPyCalix のスペクトルは、著しい変化をしめした。ナトリウム塩を少しずつ加えていくと、フリーの BisPyCalix とは異なる吸収ピークが新たに出現するが、ちょうどナトリウム塩と BisPyCalix のモル比がちょうど 1:1 になると、フリーの BisPyCalix の吸収ピークは完全に消失し、スペクトルは 1 つのコンホメーションに対応する単純な形となる。興味深いことに、このスペクトルはさらに塩を添加しても変化しない。これら NMR の実験結果は、BisPyCalix がナトリウムイオンと 1:1 の錯体を形成することをしめしている。同様なスペクトル変化は、AntPyCalix の溶液でも得られており、AntPyCalix の場合も 1:1 錯体を形成することが判明している。

NMR の結果は、蛍光ラベルしてもカリックスアレンの錯形成能が失われないということを示しており、このことはカリックスアレンを用いて蛍光プローブを設計する場合、きわめて重要な指針である。すなわち、カリックスアレンではそのイオン結合部位(C=O)の末端に蛍光色素を導入しても、錯形成能が阻害されないことを意味している。

つぎに、BisPyCalix および AntPyCalix がイオン添加にともない、蛍光変化を示すかどうかを調べた。図 3 および 4 は、チオシアン酸ナトリウムを BisPyCalix および AntPyCalix のメタノール + テトラヒドロフラン混合溶液に加えた時の蛍光スペクトルの変化を示したものである。BisPyCalix の蛍光スペクトルは、ピレンのモノマー (380 nm 付近) およびエキシマー

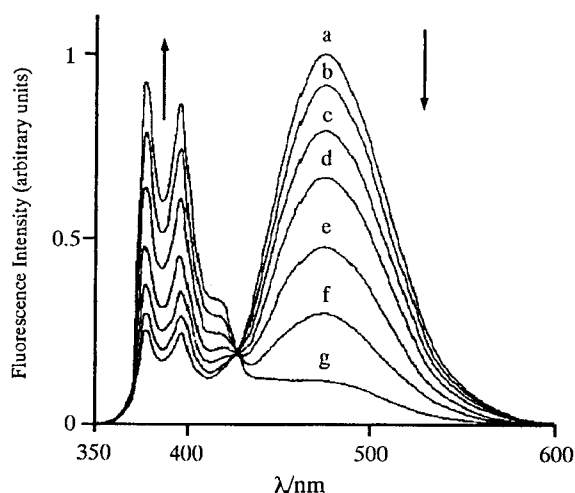


Fig.3 Na^+ titrations of the fluorescence spectra of BisPyCalix ($4.8\mu\text{mol dm}^{-3}$) in methanol-tetrahydrofuran (v/v 15:1) at 25°C : a = $[\text{NaSCN}] = 0$, b = 2.9, c = 5.8 d = 12, e = 33, f = 82, g = $428\mu\text{mol dm}^{-3}$. The spectra were measured with excitation at 330nm.

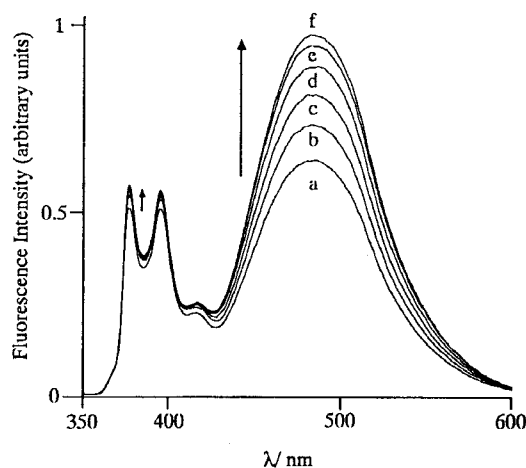


Fig.4 Na^+ titrations of the fluorescence spectra of AntPyCalix ($5.0\mu\text{mol dm}^{-3}$) in methanol-tetrahydrofuran (v/v 15:1) at 25°C : a = $[\text{NaSCN}] = 0$, b = 5.8, c = 17.4 d = 46.3 e = 104, f = $218\mu\text{mol dm}^{-3}$. The spectra were measured with excitation at 330nm.

(480 nm 付近) 2 種類の発光帯で特徴づけられる。このエキシマー発光は濃度をさらに低くしても消失しないため、分子内で形成されたエキシマーからの発光であると結論できる (分子間でのエキシマー形成は mM 程度の高濃度でなければ起きない)。したがって、ナトリウムイオン添加によるエキシマー発光の減少は、錯形

成後の BisPyCalix 分子のコンホメーション変化に起因しているものと考えられる。このことは、図 2 で示した ^1H NMR のスペクトル変化の結果とも呼応している。

BisPyCalix のイオン選択性は、他のアルカリ金属イオンに対する同様な滴定実験から錯解離定数を求めることによって評価した。BisPyCalix のナトリウム錯体の錯解離定数はメタノール + テトラヒドロフラン (15:1) 中で $37\ \mu\text{M}$ であり、他のアルカリ金属イオンの場合に比べ錯解離定数の比で 100 倍以上小さい値であった。細胞内で特に問題となるカリウムイオンに対する選択性は、ナトリウムイオンにくらべて 154 倍も低く、蛍光ナトリウムイオンプローブとして十分な選択性をもつことがわかった。

AntPyCalix も、BisPyCalix 同様その蛍光変化はナトリウムイオンに特異的であった。蛍光スペクトルは、アンスロイル基およびピレンのモノマーに由来する 2 つの発光帯で特徴づけられる。485 nm にピークをもつブロードなスペクトルは、一見ピレンとアントラセンのエキサイプレックス形成をおもわせるが、これはアンスロイル基からの発光である。実際、このブロードな発光は、ピレンを除去してもその発光波長を変えない。また、アンスロイル基とピレンを別々に蛍光ラベルしたカリックスアレンの 1:1 混合物の蛍光スペクトルと AntPyCalix の蛍光スペクトルとの比較から、AntPyCalix では、ピレンからアンスロイル基へのエネルギー移動が起こっていることが明らかとなった。

ナトリウムイオン添加後、アンスロイル基からの発

光は、ピレンのモノマーの発光に比べ、その強度を著しく増加させる。この原因として、錯形成後、ピレンからアンスロイル基へのエネルギー移動の効率が増加したことが考えられる。この点を明らかとするため、ドナーであるピレンの蛍光の減衰曲線を測定した。予想どおり、錯形成後ピレンの蛍光寿命は減少し、エネルギー移動効率の増加が蛍光変化の原因であることが明らかとなった。AntPyCalix のナトリウムイオンに対するイオン選択性は、BisPyCalix にくらべ低く、カリウムイオンに対する親和性の差は約 60 倍であった。

まとめ

2 波長による蛍光モニタリングが可能な水溶性蛍光イオンセンサーを開発するため、エキシマー発光の変化あるいはエネルギー移動による蛍光変化を利用した蛍光イオンプローブ合成し、アルカリ金属イオンに対する蛍光特性を調べた。いずれの化合物も、疎水性であるためすぐに細胞レベルでの研究に応用できるわけではないが、非水溶媒中ではナトリウムイオンを選択的に検出するための蛍光プローブとして充分機能することがわかった。実用的観点からいえば、まだ初歩的な段階にとどまっているが、エネルギー移動による蛍光変化を利用した蛍光イオンプローブの有効性を示すことができたことは、2 波長による蛍光モニタリングが可能な水溶性蛍光イオンセンサー分子設計上の基本戦略が確立できたといえる。