



Title	Rationally Designed Fluorescent Probes for Visualizing Intracellular Mg <sup>2+</sup> Dynamics
Author(s)	松井, 勇輔
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/69529">https://doi.org/10.18910/69529</a>
rights	Copyright © 2017 The Chemical Society of Japan. All Rights Reserved.
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 論 文 内 容 の 要 旨

氏 名 ( 松 井 勇 輔 )	
論文題名	Rationally Designed Fluorescent Probes for Visualizing Intracellular Mg <sup>2+</sup> Dynamics (細胞内Mg <sup>2+</sup> 動態を可視化する蛍光プローブの開発)
論文内容の要旨	
<p>Mg<sup>2+</sup>は細胞内に最も豊富に存在する2価カチオンであり、酵素活性の制御やATP・DNAの安定化、セカンドメッセンジャーなどの重要な役割を担っている。これらの役割を果たすために、細胞膜やゴルジ体・ミトコンドリア上に存在するMg<sup>2+</sup>チャネルやトランスポーターによって細胞内・オルガネラ内のMg<sup>2+</sup>濃度は厳密に制御されている。これらのチャネルの機能不全によるMg<sup>2+</sup>恒常性の欠落は、がんの悪性化や免疫疾患、神経疾患を引き起こすことが示唆されている。そのため、Mg<sup>2+</sup>濃度変化のタイミングとメカニズムを知るために、細胞内やオルガネラ内のMg<sup>2+</sup>動態や長時間のMg<sup>2+</sup>動態を調べることは生物学的にも医学的にも極めて重要である。しかし、そのような詳細なMg<sup>2+</sup>動態は未だに解明されていない。その原因が、既存Mg<sup>2+</sup>プローブの性能の限界にある。</p> <p>これまで開発されている小分子型Mg<sup>2+</sup>プローブには、①プローブが細胞内全体に拡散してしまうため、特定のオルガネラでのMg<sup>2+</sup>動態を観察できること、②時間が経つにつれてプローブがアニオントランスポーターにより細胞外に漏出してしまうため、数時間にわたる長時間イメージングができないこと、③Mg<sup>2+</sup>選択性が低く、特にCa<sup>2+</sup>に強く配位してしまうこと、④500 nm以下の比較的短波長励起を必要とするため自家蛍光や光毒性の影響があること、の4つの問題点があった。そのため、これまで詳細なMg<sup>2+</sup>動態の解析を行うことはできなかった。特にMg<sup>2+</sup>選択性の課題に関しては、過去数10年間世界で取り組まれているが、未だに実用的なプローブは開発されていないのが現状である。そこで本博士論文では、これらの課題を克服する新たなMg<sup>2+</sup>プローブの開発に取り組んだ。</p> <p>本博士論文は、以下の4章から構成されている。</p> <p>第1章では、細胞内の特定のオルガネラへの局在化と長時間イメージング可能なMg<sup>2+</sup>プローブを開発した。タグタンパク質であるHaloTagに共有結合可能なリガンドをMg<sup>2+</sup>プローブに連結させることで、細胞内においてHaloTagを発現させた場所にMg<sup>2+</sup>プローブを局在化させることができた。さらに、HaloTagとの複合化によりプローブの細胞外漏出も抑制され、24時間以上の長時間にわたりMg<sup>2+</sup>動態をイメージングも可能であった。この利点を活かし、観察に長時間を要するアポトーシス時のMg<sup>2+</sup>動態のイメージングを行った。その結果、細胞がアポトーシスを起こし、細胞縮小した後に細胞内のMg<sup>2+</sup>濃度が増大し、これは細胞内に多量に存在するMg-ATPからMg<sup>2+</sup>が解離したためであることが初めて示唆された。</p> <p>第2章では、Mg<sup>2+</sup>選択性的な蛍光プローブの開発に取り組んだ。Mg<sup>2+</sup>選択性的な配位子を設計する上でMg<sup>2+</sup>とCa<sup>2+</sup>の錯体構造の違いに着目し、適切な位置に配位原子を固定した小さくrigidな配位子を設計することでMg<sup>2+</sup>選択性的なプローブを開発できると考えた。この考えの下考案した2,8-dicarboxyquinolineを配位子として有するMg<sup>2+</sup>プローブは、錯形成で消光型の応答を示し、細胞内においてCa<sup>2+</sup>濃度変化に応答せずにMg<sup>2+</sup>濃度変化を検出可能であった。さらに、本プローブは、既存のMg<sup>2+</sup>選択性プローブでは不可能であった遊離のMg<sup>2+</sup>とMg-ATPの識別も可能であることが分かった。</p> <p>第3章では、特定のオルガネラへの局在化能、長時間イメージング能、高いMg<sup>2+</sup>選択性の3つの特性を兼ね備えたMg<sup>2+</sup>プローブの開発に取り組んだ。第1章でMg<sup>2+</sup>プローブとHaloTagを組み合わせることで確立した局在化・長時間イメージング技術と第2章で開発したMg<sup>2+</sup>選択性プローブを融合させることで、特定のオルガネラでのMg<sup>2+</sup>動態を選択性的に長時間イメージング可能なMg<sup>2+</sup>プローブを開発した。これにより、これまで高濃度のCa<sup>2+</sup>の存在のために可視化できなかったオルガネラ（ER、ゴルジ体、ミトコンドリア）におけるMg<sup>2+</sup>動態を解析することが可能になった。</p> <p>第4章では、第2章で開発したMg<sup>2+</sup>選択性配位子に赤色蛍光を有する色素を組み込むことで、赤色消光型のMg<sup>2+</sup>高選択性プローブを開発した。さらに、開発したプローブと緑色発蛍光型のMg<sup>2+</sup>プローブを併用することで、可視光励起でのMg<sup>2+</sup>のレシオイメージングが可能になった。本検出系は、UV励起が必要な既存のレシオ型プローブよりも低い光毒性で高感度にMg<sup>2+</sup>濃度変化を検出でき、細胞内における濃度変動の小さいMg<sup>2+</sup>の検出に非常に有用であることを示した。</p> <p>結論では、以上の結果について総括し、今後の展望について記した。</p>	

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 松井 勇輔 )	
	(職) 氏 名
論文審査担当者	主査 教授 菊地 和也
	副査 教授 中山 健一
	副査 教授 伊東 忍
	副査 教授 大政 健史
	副査 教授 高井 義造
	副査 教授 渡部 平司
	副査 教授 兼松 泰男

## 論文審査の結果の要旨

本博士論文は、細胞内の  $Mg^{2+}$  濃度変化に応じて蛍光強度が変化する小分子蛍光プローブについて述べている。細胞内・オルガネラ内の  $Mg^{2+}$  濃度は、 $Mg^{2+}$  チャネルやトランスポーターによっては厳密に制御されている。これらのチャネルの機能不全による  $Mg^{2+}$  恒常性の欠落は、様々な疾患を引き起こすことが知られている。そのため、細胞内やオルガネラ内の  $Mg^{2+}$  動態を長時間にわたり調べることは生物学的にも医学的にも極めて重要である。しかし、既存  $Mg^{2+}$  プローブには、特定のオルガネラに局在できること、プローブが細胞外に漏出するため長時間イメージングできること、 $Mg^{2+}$  選択性が低く  $Ca^{2+}$  に強く配位してしまうこと、500 nm 以下の比較的短波長励起を必要とするため自家蛍光や光毒性の影響があることの 4 つの問題がある。そのため、これまで詳細な  $Mg^{2+}$  動態を調べることができなかつた。そこで、本論文はこれらの課題を克服するための新たな  $Mg^{2+}$  プローブの開発に取り組んでいる。本論文は、第 1 章、第 2 章、第 3 章、第 4 章、結論および展望から構成されており、以下に本論文の成果を要約する。

第 1 章では、特定のオルガネラへの局在化と長時間イメージングが可能な  $Mg^{2+}$  プローブの開発について述べている。タグタンパク質である HaloTag に特異的に結合可能リガンドを  $Mg^{2+}$  プローブに連結させたプローブ “MGH” を開発することで、細胞内において HaloTag を発現させた場所に  $Mg^{2+}$  プローブを局在化させることができた。さらに、HaloTag との複合化によりプローブの細胞外漏出も抑制され、24 時間以上の長時間にわたり  $Mg^{2+}$  動態をイメージング可能であった。この利点を活かし、観察に長時間を要するアポトーシス時の  $Mg^{2+}$  動態のイメージングを行った。その結果、細胞がアポトーシスを起こし、細胞縮小した後に細胞内の  $Mg^{2+}$  濃度が増大し、これは細胞内に多量に存在する Mg-ATP から  $Mg^{2+}$  が解離したためであることを初めて明らかにした。

第 2 章では、 $Mg^{2+}$  選択性的な蛍光プローブの開発について述べている。既存の  $Mg^{2+}$  プローブには APTRA という配位子が広く用いられている。APTRA は細胞内の遊離の  $Mg^{2+}$  濃度変化を検出するのに適した親和性を有しているが、 $Ca^{2+}$  により強く配位するため、 $Ca^{2+}$  濃度上昇が起きる生命現象や  $Ca^{2+}$  が豊富に存在するオルガネラでの  $Mg^{2+}$  動態を可視化することができなかつた。そこで新たな  $Mg^{2+}$  選択性的な配位子を設計するために、 $Mg^{2+}$  と  $Ca^{2+}$  の錯体構造の違いに着目し、適切な位置に配位原子を固定した小さく rigid な配位子を設計することで  $Mg^{2+}$  選択性的なプローブ “MGQ-2” の開発に成功している。本プローブは、 $Mg^{2+}$  との錯形成で蛍光強度が大きく変化し、細胞内において  $Ca^{2+}$  濃度変化に応答せずに  $Mg^{2+}$  濃度変化を検出可能であった。

第 3 章では、特定のオルガネラへの局在化能、長時間イメージング能、高い  $Mg^{2+}$  選択性の 3 つの特性を兼ね備えた  $Mg^{2+}$  プローブの開発について述べている。第 1 章で確立した HaloTag を用いた局在化・長時間イメージング技術と第 2 章で開発した  $Mg^{2+}$  選択性プローブを融合させることで、特定のオルガネラでの  $Mg^{2+}$  動態を選択性的に長時間イメージング可能な  $Mg^{2+}$  プローブ “MGQ-2-Halo” を開発した。これにより、これまで高濃度の  $Ca^{2+}$  の存在のために可視化できなかつた

たオルガネラにおける  $Mg^{2+}$  動態を詳細に解析することが可能になった。

第4章では、第2章で開発した  $Mg^{2+}$  選択性配位子に赤色蛍光を有するロドール骨格の色素を組み込んだ赤色消光型の  $Mg^{2+}$  選択性プローブの開発について述べている。 $Mg^{2+}$  選択性的な赤色蛍光プローブ “MGQR” を開発し、開発した消光型赤色プローブと発蛍光型緑色  $Mg^{2+}$  プローブを併用することで、可視光励起での  $Mg^{2+}$  のレシオイメージングに応用している。本検出系は、UV 励起が必要な既存のレシオ型プローブよりも低い光毒性で高感度に  $Mg^{2+}$  濃度変化を検出でき、細胞内における濃度変動の小さい  $Mg^{2+}$  の検出に非常に有用であることを示した。

以上のように、本論文は従来の  $Mg^{2+}$  プローブの課題を克服し、特定のオルガネラへの局在化、長時間イメージング、選択性的な  $Mg^{2+}$  の検出、赤色領域の長波長蛍光検出が可能なプローブの開発に成功している。これにより、これまで優れた蛍光プローブの不足のため調べることができなかつた細胞内やオルガネラ内の  $Mg^{2+}$  動態を詳細に解析することが可能となり、 $Mg^{2+}$  プローブの開発研究を大きく躍進させるたといえる。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。