

一般口頭発表

■ 2023年9月9日(土) 9:30 ~ 10:50 | 会場 C会場 16号館 1611教室

イメージング・分析

座長：椎名 勇（東京理科大学理学部第一部部応用化学科）

9:30 ~ 9:50

[20C-01] 酵素反応に伴う凝集体形成を活用したactivatable型ラマンプローブによる選択的ex vivoイメージング

*藤岡 礼任¹、河谷 稔^{1,2}、浦野 泰照^{2,3}、小幡 史明⁴、小関 泰之⁵、神谷 真子^{1,6} (1. 東京工業大学 生命理工学院、2. 東京大学大学院 医学系研究科、3. 東京大学大学院 薬学系研究科、4. 理研BDR、5. 東京大学 先端科学技術研究センター、6. 東京工業大学 国際先駆研究機構)

9:50 ~ 10:10

[20C-02] 顕微ラマン分光イメージングによる生きた細胞の薬剤取り込み観察

*畔堂 一樹^{1,2}、Li Menglu^{2,1}、Hao-Xiao Liao²、名和 靖矩³、藤田 聡史^{1,2}、藤田 克昌^{2,1} (1. 産業技術総合研究所、2. 大阪大学、3. 関西学院大学)

10:10 ~ 10:30

[20C-03] 超耐光性かつ環境応答性を有するミトコンドリア標識剤を用いた内膜動態イメージング

*多喜 正泰¹、WANG Junwei¹、山口 茂弘^{1,2} (1. 名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所、2. 名古屋大学大学院理学研究科)

10:30 ~ 10:50

[20C-04] 近赤外蛍光レセプターバインディングアッセイおよびN2aアッセイによるシガトキシン同族体の相対効力評価

*横関 俊昭^{1,2}、濱 悠佳²、藤田 和弘¹、五十嵐 友二¹、平間 正博^{2,3}、円谷 健^{2,3} (1. 一般財団法人日本食品分析センター研究開発部、2. 大阪府立大学大学院理学系研究科、3. 大阪公立大学大学院理学研究科)

酵素反応に伴う凝集体形成を活用した activatable 型ラマンプローブによる選択的 *ex vivo* イメージング

○藤岡礼任¹・河谷稔^{1,2}・浦野泰照^{2,3}・小幡史明⁴・小関泰之⁵・神谷真子^{1,6} (1 東工大生命理工、2 東大院医、3 東大院薬、4 理研 BDR、5 東大先端研、6 東工大国際先駆研究機構)

Activatable Raman probe utilizing enzyme-induced aggregate formation for selective *ex vivo* imaging
(Department of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology¹, Graduate School of Medical Sciences, The University of Tokyo², Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo³, RIKEN BDR⁴, Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo⁵, Living Systems and Materialogy Research group, Tokyo Institute of Technology⁶) FUJIOKA, Hiroyoshi¹; KAWATANI, Minoru^{1,2}; URANO, Yasuteru^{2,3}; OBATA, Fumiaki⁴; OZEKI Yasuyuki⁵; KAMIYA, Mako^{1,6}

ラマン顕微法は、無染色または微小アルキンタグを用いた生体分子の可視化、多重標識タグを用いた多色イメージングなどで近年注目を集めている。我々はこれまでに、共鳴ラマン効果を活用することで、標的酵素との反応によって始めてラマン信号が on となる activatable 型ラマンプローブの開発に成功してきた¹が、開発したラマンプローブは細胞内滞留性が低く、生体組織の標的酵素発現領域を特異的に検出することは困難であった。そこで本研究においては、このような課題を克服可能なラマンプローブ開発に着手した。

具体的には、先行研究でプローブ母核色素として用いた 9CN-pyronin 誘導体の 3 位のアミノ基をヒドロキシ基に置換した 9CN-rhodol 誘導体が、中性条件下で高い凝集性を有することに着目し、酵素反応後に生成する色素の凝集体形成によって細胞内滞留性が向上し、標的酵素発現領域のみを選択的に検出可能になると考えた。そこで、最適な 9CN-rhodol 骨格を探索するべく種々の誘導体を合成し、その特性を評価した。その結果、9CN-JCR を最適なプローブ母核として選定し、異なるグリコシダーゼやアミノペプチダーゼを標的とした 3 種類のラマンプローブを開発することで、生きた細胞における 3 種類の酵素活性の同時検出に成功した。さらに、開発した 9C¹⁵N-JCR-Bn-βGal は、酵素反応後の凝集体形成によって組織においても標的酵素である β-galactosidase の発現領域を特異的に検出することが可能であった²⁾。

1) H. Fujioka, J. Shou, R. Kojima, Y. Urano, Y. Ozeki, M. Kamiya, *J. Am. Chem. Soc.*, **142**, 20701–20707 (2020)

2) H. Fujioka, M. Kawatani, S. Spratt, A. Komazawa, Y. Misawa, J. Shou, T. Mizuguchi, H. Kosakamoto, R. Kojima, Y. Urano, F. Obata, Y. Ozeki, M. Kamiya, *J. Am. Chem. Soc.*, **145**, 8871–8881 (2023)

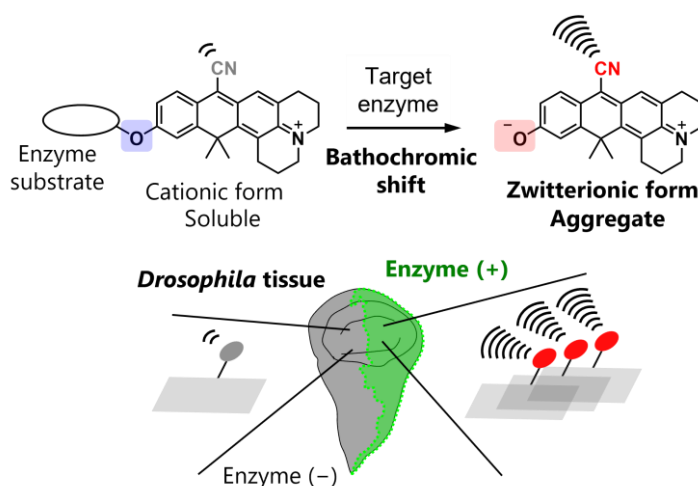


Fig. 1 Schematic illustration of activatable Raman probe utilizing enzyme-induced aggregate formation for selective *ex vivo* imaging.

顕微ラマン分光イメージングによる生きた細胞の薬剤取り込み観察

○畔堂一樹^{1,2}・Li Menglu^{1,2}Hao-Xiao Liao² 名和靖矩³ 藤田聡史^{1,2} 藤田克昌^{1,2,4}

(¹産総研、²阪大院工³関西学院大学⁴阪大先導的学祭研究機構)

Observation of drug uptake in living cells by Raman spectroscopic imaging (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology¹, Graduate School of Engineering, Osaka University², Kuwansei Gakuin University³, Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka University) BANDO, Kazuki^{1, 2}, LI, Menglu^{1,2}, HAO-XIAO, Liao², NAWA, Yasunori³, FUJITA, Satoshi^{1,2}, FUJITA, Katsumasa^{1,2,4}

ラマン分光分析は、細胞や薬物に内在する固有の分子を化学構造によって与えられる分子振動情報として、標識することなく検出できるため、生化学の分野でも活用が期待されている。細胞や組織の試料そのものの状態や、薬物と細胞の相互作用をラベルフリーで分析可能になる。我々は自作のラマン散乱顕微鏡を開発し¹⁾、生体試料を生きたままラマンイメージング観察する手法の開発に取り組んでいる。今回は細胞内の薬物動態観察について報告を行う。

細胞内部の薬物分布とそれに続く細胞反応をリアルタイムかつライブセルレベルで可視化することは、薬物の作用機序を理解するための新たな知見となる。しかし、細胞内の薬物分布を可視化する効率的な方法がないため、標的部位における薬物効果の詳細な検討が滞っている。薬物の取り込みとそれに続く細胞応答を、生きたまま、あるいは単一細胞レベルで可視化できる技術があれば、薬効薬理効果を正確に理解することが期待できる。

今回我々はアクチノマイシン D (ActD) に注目し、生きた細胞の薬物動態の観察をおこなった。²⁾ActD は、DNA の二重らせんに挿入して RNA 合成を阻害することにより、細胞のアポトーシスを誘導する抗生物質として知られている。ActD の DNA へのインターカレーションは、溶液中では吸収、蛍光、ラマン顕微鏡を用いて多く研究されているが、生きた細胞での観察は報告されていない。我々は、自作のラマン顕微鏡を用いて、ActD による細胞毒性と生細胞における ActD の分布を観察した。還元型シトクロム c (cyt c) の減少は、cyt c の放出よりも細胞アポトーシスの初期マーカーであることがわかった。さらに、ActD が核内に入ると 1266cm⁻¹ から 1259cm⁻¹ へのシフトが検出され、ラマンイメージングにより ActD の核内分布が確認され、その作用機序と関連することが示された。ラマン顕微鏡による細胞内薬物取り込みと細胞毒性の同時観察が可能となり、今後の潜在的な薬物細胞毒性の予測が可能となった。

1) Almar F. Palonpon, Jun Ando, Hiroyuki Yamakoshi, Kosuke Dodo, Mikiko Sodeoka, Satoshi Kawata, Katsumasa Fujita, "Raman and SERS microscopy for molecular imaging of live cells," Nat. Protoc., Vol. 8, pp. 677-692 (2013).

2) Menglu Li, Hao-Xiang Liao, Kazuki Bando, Yasunori Nawa, Satoshi Fujita, and Katsumasa Fujita "Label-free monitoring of drug-induced cytotoxicity and its molecular fingerprint by live-cell Raman and autofluorescence imaging,"

超耐光性かつ環境応答性を有するミトコンドリア標識剤を用いた内 膜動態イメージング

○多喜正泰¹・Junwei WANG¹・山口茂弘^{1,2} (名大 ITbM¹、名大院理²)

Imaging of Inner Mitochondrial Membrane Dynamics Using a Super-photostable and Environment-sensitive Fluorescent Marker (Institute of Transformative Bio-Molecules, Nagoya University¹, Graduate School of Science, Nagoya University²) TAKI, Masayasu¹; WANG, Junwei¹; YAMAGUCHI, Shigehiro^{1,2}

ほとんどのオルガネラは脂質膜に囲まれており、それぞれのオルガネラが独自の機能をもちながら互いに連携することで複雑な細胞機能を維持している。ミトコンドリアは、内膜 (IMM) と外膜 (OMM) から構成される二重の膜構造を特徴とし、IMM はひだ状に折りたたまれたクリステ構造を有する。IMM には多価不飽和脂肪酸で構成されるカルジオリピンを多く含み、ミトコンドリア膜形態やオルガネラ間相互作用、タンパク質の発現などに重要な役割を果たしている。我々は、超耐光性ミトコンドリア標識剤 MitoPB Yellow を開発し、超解像 STED イメージング技術を用いてライブセルにおけるクリステ動態を可視化することに成功してきた^[1]。本研究では、2つのホスホリル基を含んだ環境応答性ミトコンドリア標識剤 MitoPB Red を開発し (図1)、蛍光寿命イメージング (FLIM) を用いた膜動態追跡を行った。

MitoPB Red で染色した細胞を STED 顕微鏡で観察したところ、クリステ構造が明瞭に観察され、MitoPB Yellow と同様に高い IMM 特異性を有していることが確認された。また、MitoPB Red は液体無秩序相 (Lo 相) と液体秩序相 (Ld 相) の極性の違いを蛍光寿命の違いとして高感度に検出することができることもわかった。したがって、本プローブを用いることにより、IMM 特性の変化をリアルタイムで追跡できるものと考えた。

図2に MitoPB Red で染色した HeLa 細胞の FLIM 画像を示す。蛍光寿命は非常に広い分布を示したことから、IMM の膜特性は一様でないことが明らかとなった。興味深いことに、一つのミトコンドリア内であっても膜特性は不均一であり、Lo 相と Ld 相がドメインを形成している様子が観察された。また、飽和脂肪酸であるパルミチン酸、あるいは多価不飽和脂肪酸であるリノール酸存在下で細胞を培養し、FLIM で観察したところ、前者では Lo 相の形成に伴う蛍光寿命の長寿命化が認められたのに対し、後者のミトコンドリアでは大幅な短寿命化が認められた。これは、リノール酸を含むカルジオリピンが効率よく生合成され、膜秩序が著しく低下したためと考えられる。次に、Time-lapse FLIM を実施したところ、脂質膜特性が経時的に Lo 相に変化する様子がライブで捉えられた。これは、IMM に含まれるカルジオリピンが活性酸素種によって酸化されることで不飽和脂質の濃度が低下し、結果的に飽和脂質の構成比が上昇したためと考えられる。実際、ミトコンドリア内で活性酸素種を発生させることが知られているバリノマイシンや CCCP で細胞を処理すると、ミトコンドリアの形態変化と膜特性の変化を同時に捉えることに成功した。

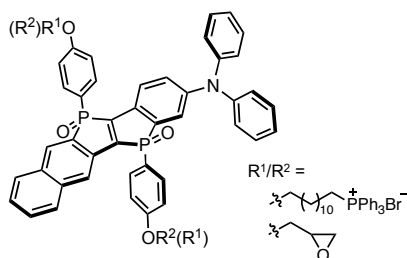


図1 MitoPB Red の構造

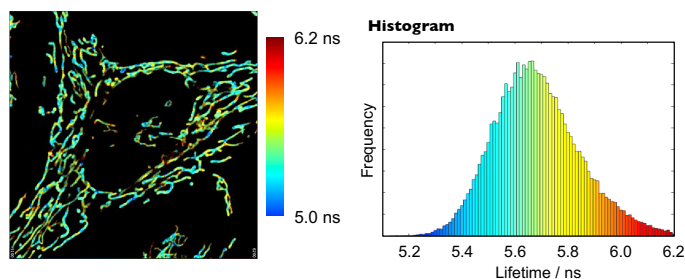


図2 MitoPB Red を用いた HeLa 細胞の FLIM 画像 (左) と
蛍光寿命のヒストグラム (右)

[1] M. Taki, S. Yamaguchi *et. al.*, *PNAS* **2019**, *116*, 15817.

近赤外蛍光レセプターバインディングアッセイおよび N2a アッセイによるシガトキシン同族体の相対効力評価

○横関俊昭^{1,2}・濱悠佳²・藤田和弘¹・五十嵐友二¹・平間正博^{2,3}・円谷健^{2,3}

(¹一般財団法人日本食品分析センター研究開発部、²大阪府立大学院理、³大阪公立大学院理)

Evaluation of Relative Potency of Calibrated Ciguatoxin Congeners by Near-infrared Fluorescent Receptor Binding and Neuroblastoma Cell-based Assays (Department of Research & Development, Japan Food Research Laboratories¹, Graduate School of Science, Osaka Prefecture University², Graduate School of Science, Osaka Metropolitan University³) YOKOZEKI, Toshiaki^{1,2}; HAMA, Yuka²; FUJITA, Kazuhiro¹; IGARASHI, Tomoji¹; HIRAMA, Masahiro^{2,3}; TSUMURAYA, Takeshi^{2,3}

シガトキシン(CTX)は、世界で年間 5 万人以上に被害を及ぼす魚類食中毒シガテラの原因毒素である。その分析法として、CTX が電位依存性ナトリウムチャンネル(Nav チャンネル)に結合する性質を利用したレセプターバインディングアッセイ(RBA)および N2a アッセイがあるが、従来の RBA は高価な CTX 標準品を多量に消費し、N2a アッセイは所要時間が 48 時間以上という欠点がある。そこで本研究では、これらの欠点の改善を検討した。さらに、これらのアッセイにおける CTX 同族体の相対効力を知ることは、複数の同族体が混在する魚肉の総毒性を評価するために重要だが、過去の評価結果は研究間で大きく乖離し、これは使用された CTX 濃度の不正確さが原因と考えられる。したがって、定量 NMR で値付けされた標準品¹⁾を使用し、両アッセイにおける相対効力を正確に評価した。

まず、ブレベトキシン(BTX, RBA における CTX に対する競合リガンド)の近赤外蛍光標識体 PREX710-BTX(Fig. 1)を合成し、これを用いることにより従来よりも CTX の必要量が 1/4 以下の高感度 RBA を開発した。続いて、N2a アッセイの条件を最適化し、従来法と同等の感度を維持したまま、従来法で実施されていた N2a 細胞の 24 時間のプレ培養を省略した。最後に、値付けされた CTX 同族体の Nav チャンネル結合親和性および細胞毒性を両アッセイで評価し、IC₅₀および EC₅₀を算出した(Table 1)。Nav チャンネル結合親和性においては、同族体間でほとんど差異はなく、マウス毒性²⁾と関連しなかった。さらに、この結果から同族体間の側鎖構造等の違いは、結合親和性に影響を及ぼさないことが明らかになった。一方、N2a 細胞に対する毒性はマウス毒性と良く相関することから、N2a アッセイがマウス毒性試験法の優れた代替法となることが実証された³⁾。

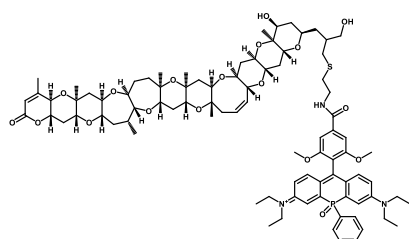


Fig. 1. Structure of PREX710-BTX.

Table 1. IC₅₀s, EC₅₀s and TEFs of CTX congeners.

Congeners	Binding affinities IC ₅₀ ± SD (pg/mL)	Cytotoxicities EC ₅₀ ± SD (pg/mL)	Toxic equivalency factors (TEFs) based on acute toxicity in mice
CTX1B	336.4 ± 46.9 (1.0)	1.08 ± 0.06 (1.0)	1.0
CTX3C	331.4 ± 36.4 (1.0)	2.03 ± 0.20 (0.5)	0.2
CTX4A	376.8 ± 51.1 (0.9)	12.4 ± 0.89 (0.09)	0.1
52-epi-54-deoxyCTX1B	268.0 ± 26.2 (1.3)	2.98 ± 0.24 (0.4)	0.3
54-deoxyCTX1B	230.4 ± 26.7 (1.5)	2.73 ± 0.18 (0.4)	0.3
51-hydroxyCTX3C	286.1 ± 24.3 (1.2)	1.18 ± 0.10 (0.9)	1.0

Parentheses shows relative values when CTX1B is set to 1.0.

1) Kato, T., Yasumoto, T., *Mar. Drugs* 15, 309 (2017).

2) European Food Safety Authority (EFSA), *EFSA J.* 8, 1627 (2010).

3) Yokozeki, T., Hama, Y., Fujita, K., Igarashi, T., Hirama, M., Tsumuraya, T. *Toxicon* 230, 107161 (2023).