

植物細胞やポリマー分析のための 変色する蛍光色素

北海道大学 大学院地球環境科学研究院
物質機能科学部門 生体物質科学分野
准教授 山田 幸司

2024年10月10日

蛍光を使った分析法の利点

電気化学測定・MRI測定・近赤外吸収測定などと比べが、

- ・ 感度が高い（一般的な装置で 10^{-9} mol/L）
- ・ 時間分解能が高い（～100 ピコ秒）
- ・ 空間分解能が高い（～250 nm）
- ・ 低侵襲で生きた細胞も観察できる
- ・ 光源・**蛍光色素**・受光素子からなる単純な装置

これらの特性を生かして蛍光顕微鏡を用いて細胞内の挙動の観察など主に医学的な用途に用いられる。

変色する蛍光色素のメリット

蛍光色素には一定波長で光るだけでなく、環境によって発光波長が変わる（変色）機能性色素があるが、

- ・イメージング装置で色素周囲の環境変化を識別しやすい
- ・レシオメトリー測定により高い定量性が得られる

等の大きなメリットがある。

FRETタンパク (既存の変色蛍光色素 1)

2色の蛍光タンパクを構造の大きく変わるタンパクで繋ぎ、
共鳴蛍光エネルギー移動 (FRET) の効率を変えて蛍光色を変える。

代表例) Cameleon (Ca²⁺ インジケーター)



メリット

- ・ 組み換え遺伝子を導入することで生体内で発現できる。

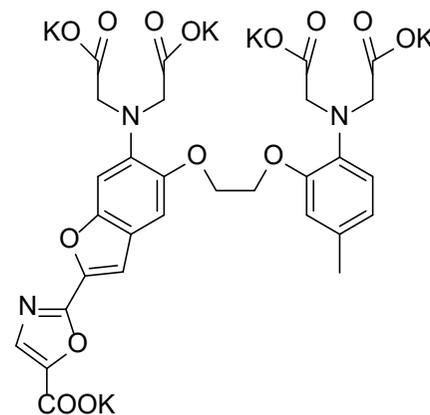
デメリット

- ・ 分子量が10万を超えるため生体反応を阻害する可能性が高い。
- ・ 原理的に2つの蛍光タンパクの距離が変わらないと波長応答しない。

ICT色素 (既存の変色蛍光色素 2)

金属イオンを捕捉する部位に電子供与基を入れ、分子内電荷移動 (ICT) の強度を変化させることで蛍光色を変える

代表例) Fura-2 (Ca²⁺インジケーター)



メリット

- ・分子量がFRETタンパクの100分の1以下で生体反応を阻害しにくい。

デメリット

- ・生体内で発現しないため外部から色素を導入する必要がある。
- ・原理的に水素イオンや金属イオンしか分析対象に出来ない。

蛍光ソルバトクロミック色素

分子周囲の溶媒極性（油に近いか水に近いか）によって蛍光色が変わる機能性色素。

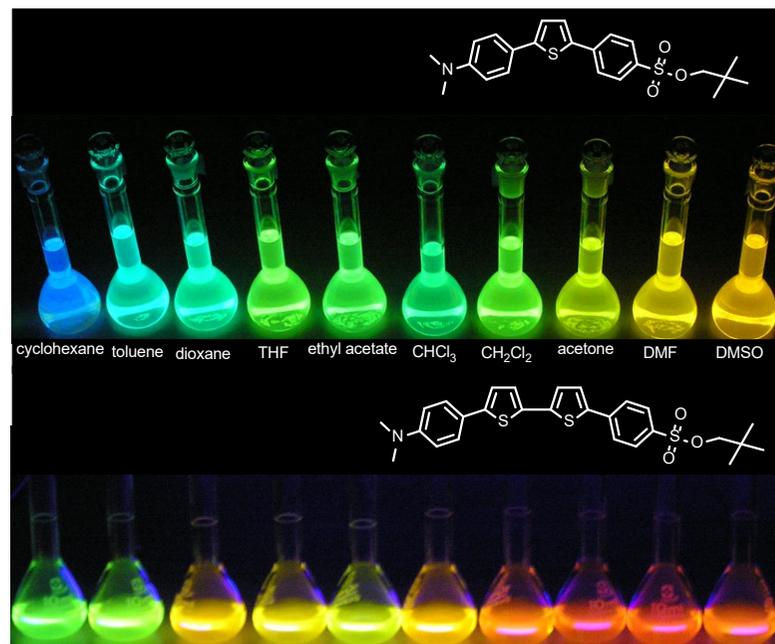
メリット

- ・分子量がFRETタンパクの100分の1以下で生体反応を阻害しにくい。
- ・溶媒極性によって吸収波長はほとんど変わらないので単一光源で励起が可能。

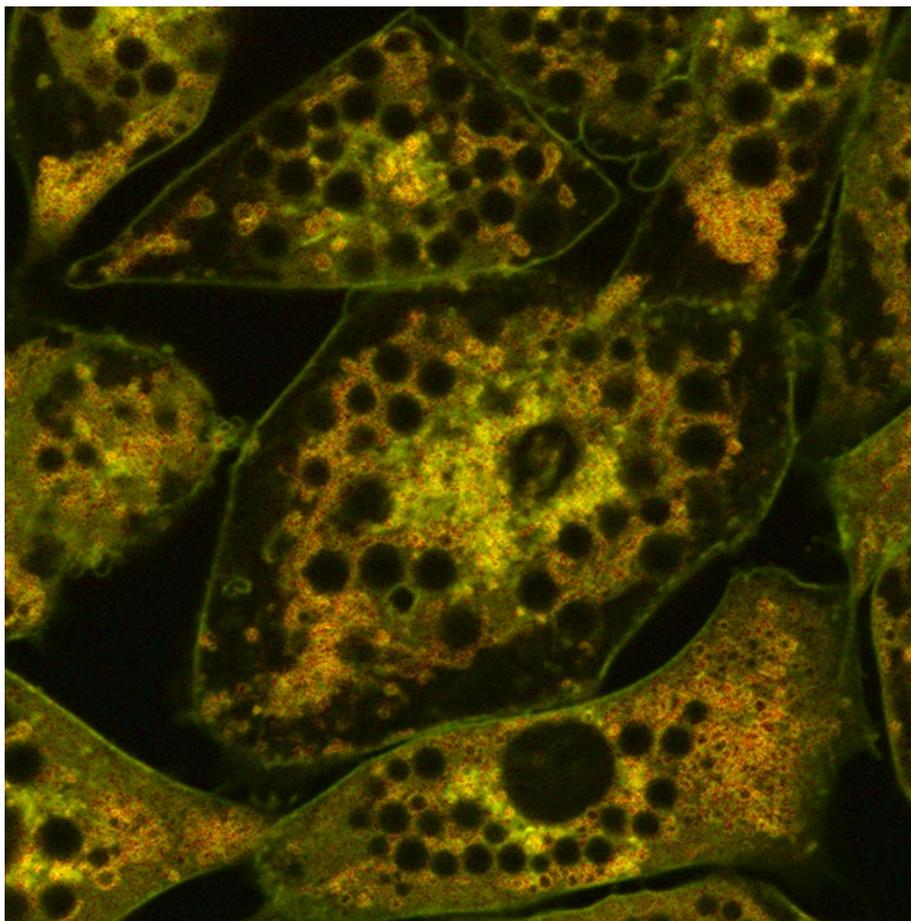
デメリット

- ・生体内で発現しないため外部から色素を導入する必要がある。
- ・可視光で励起できる誘導体が少なかったため侵襲性が高い。

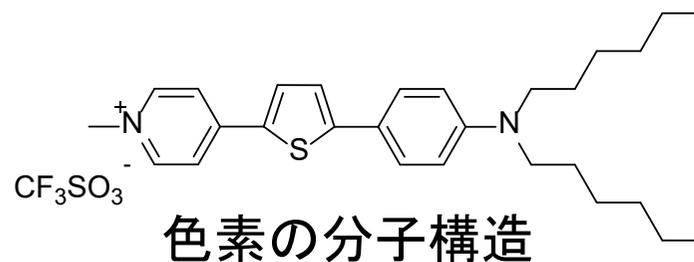
チオフェンを母骨格にして可視光で励起できる誘導体を開発



当研究室で開発された従来型色素



ラット内臓脂肪の共焦点蛍光顕微鏡画像
(励起波長 $\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$)



- ・色素の分子構造に両親媒性分子を組み込むことで、細胞膜に馴染みやすくなり、色素のエタノール溶液を細胞近傍で放出することで、**動物細胞**を容易に蛍光染色できる。
- ・細胞膜で緑、ミトコンドリアでオレンジ、小胞体で黄色と、細胞小器官で明確な識別ができた。
- ・心筋細胞を蛍光染色して2ヵ月拍動が続くほど細胞毒性も低いと思われる。

従来型色素の問題点

内部水相や細胞核内部など親水部位は蛍光染色できない。
色素が細胞壁を透過できないので植物細胞には利用できない。

→色素の水溶性の向上

また、脂溶性部位も選択的に蛍光染色できていない。

→生理活性部位などの導入

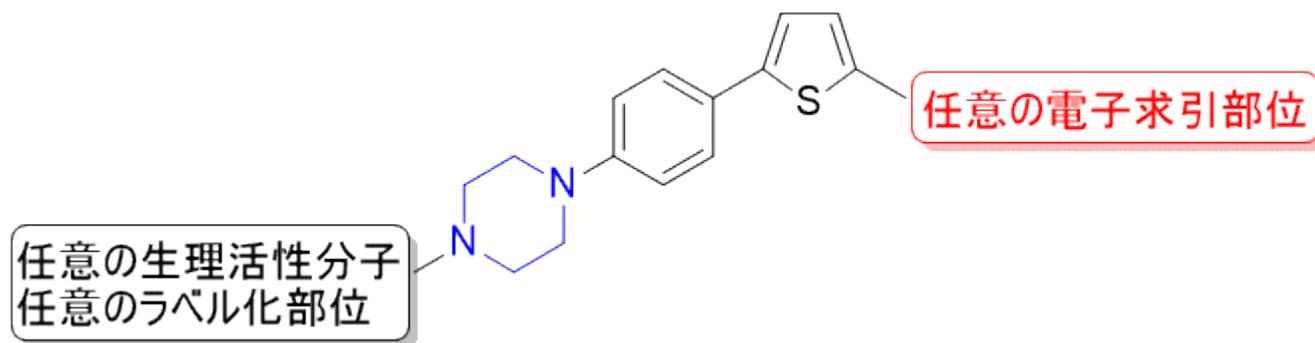
さらに、変色機構が解明できていない。

→評価系の検討

色素が両親媒性を持つため大量合成が難しい。

→合成法の改良

新規変色型蛍光色素の特長



ジアルキルアミノ基の代わりに立体的なピペラジン環を用いることで、平面的な蛍光色素の π - π スタッキング相互作用を抑制し、溶媒に対する溶解性を向上させた。

電子供与性の窒素と任意のラベル化部位を連結させる窒素を独立させることで、ラベル化による色素の光物性の変化を抑えた。

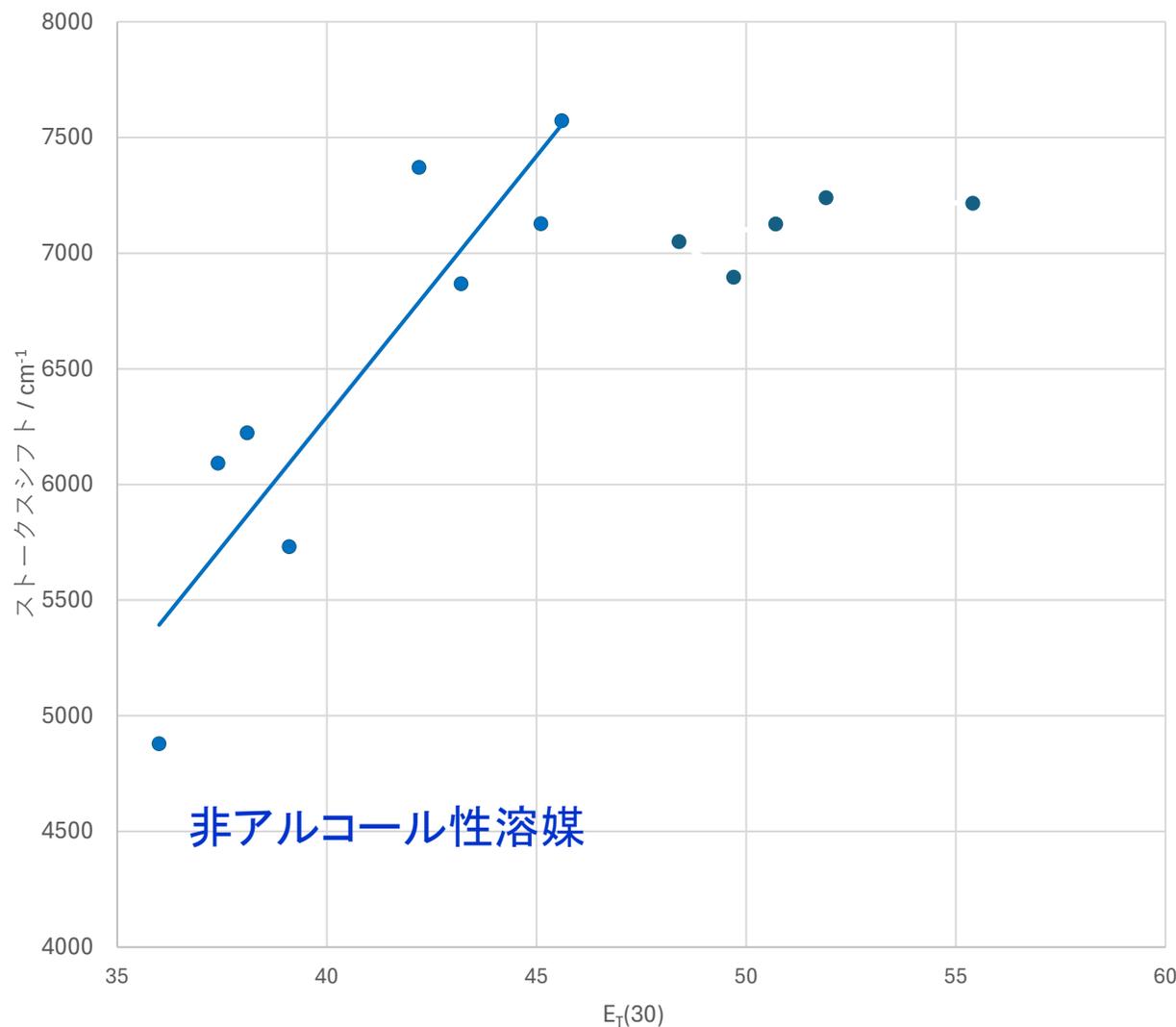
鈴木-宮浦クロスカップリング法などで、電子求引部位を入れ替えることで、相互作用による応答性や吸収・蛍光発光波長など光物性の調整を行うことができる。

ソルバトクロミズム (新規色素の波長応答原理 1)

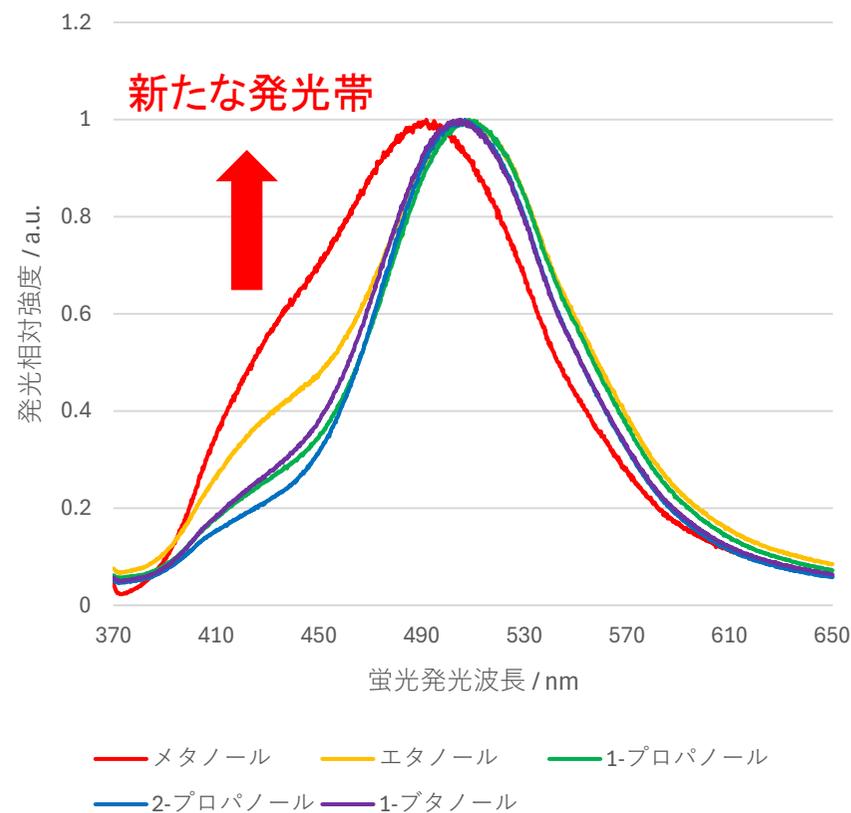
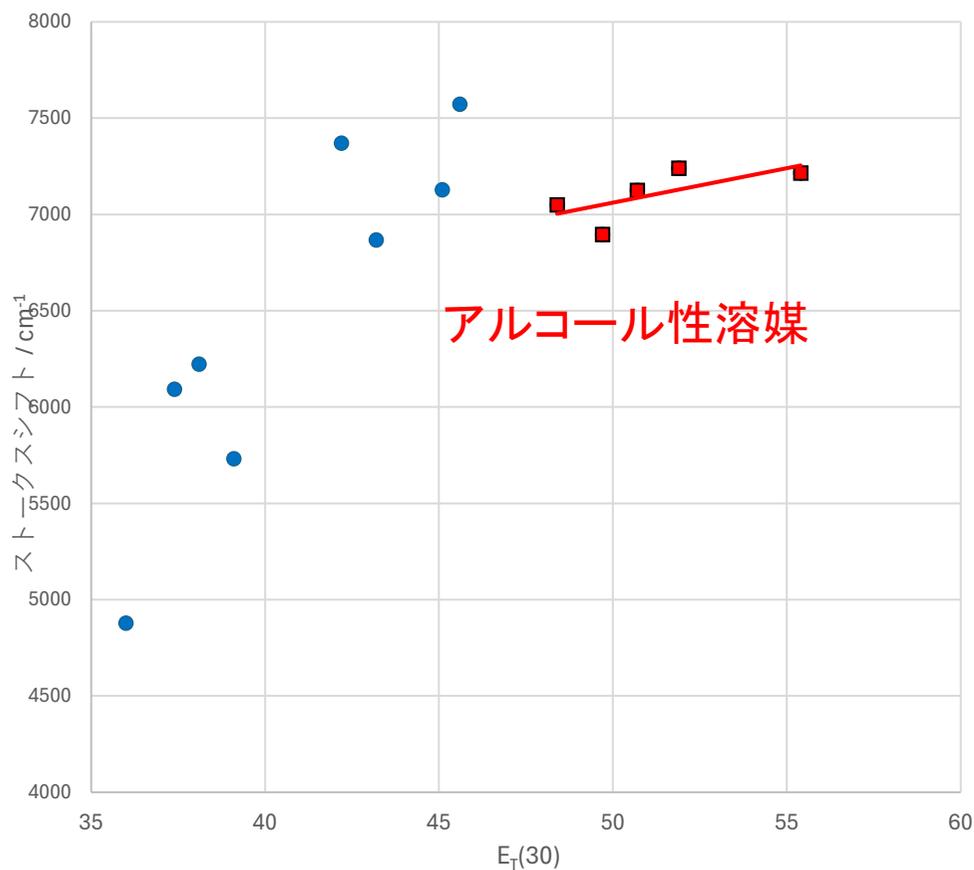


非アルコール性溶媒中では従来の色素と同様のソルバトクロミズム様の応答を示す。

$\lambda_{\text{abs}} \sim 370 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 450 \sim 525 \text{ nm}$



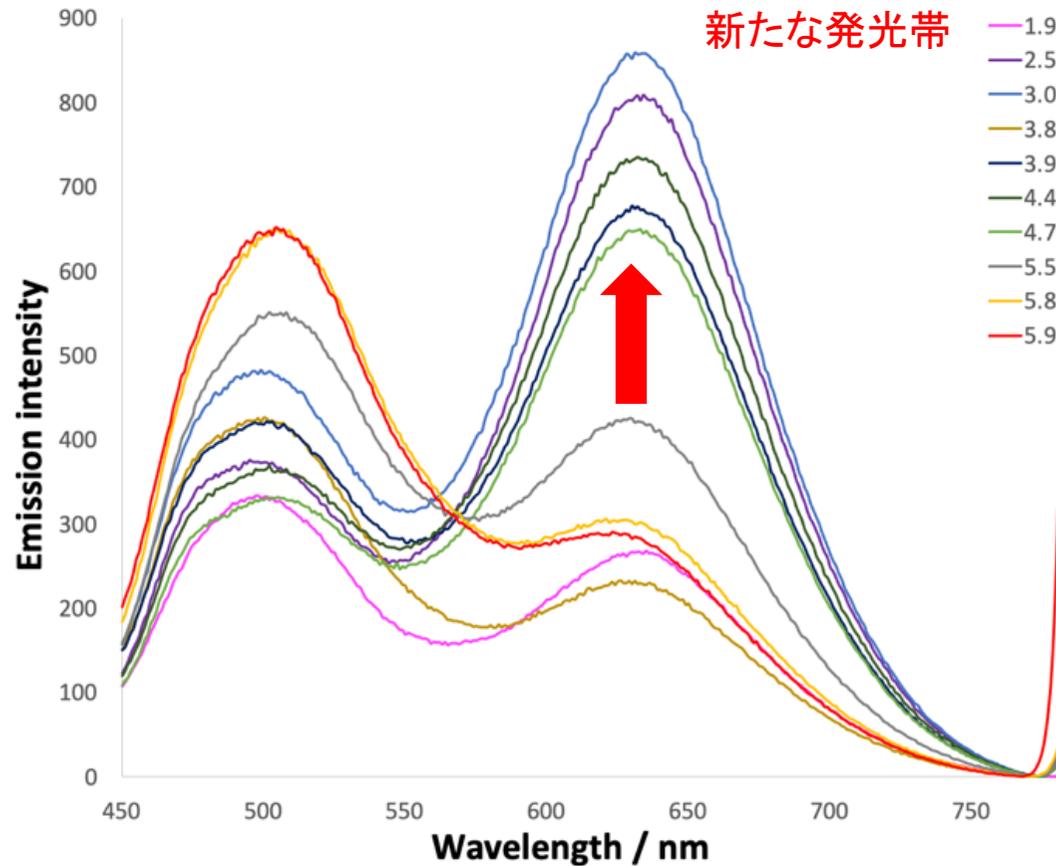
水素結合 (新規色素の波長応答原理 2)



アルコール性溶媒中では非アルコール性溶媒と挙動が異なり、水素結合のできやすさの順で短波長に発光が強くなる。

$\lambda_{\text{abs}} \sim 345 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 405 \text{ nm}$

配位結合 (新規色素の波長応答原理 3)

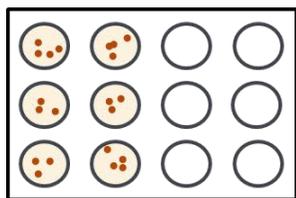


色素の溶液に水素イオンを添加すると、長波長側に新たな蛍光が現れた。

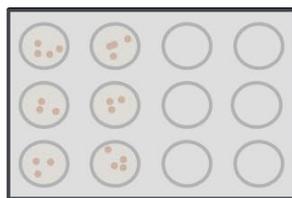
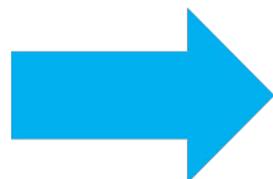
原理的には金属イオンでも同様の応答が見られると思われる。

$$\lambda_{\text{abs}} \sim 415 \text{ nm}, \lambda_{\text{em}} = 630 \text{ nm}$$

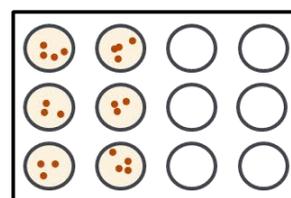
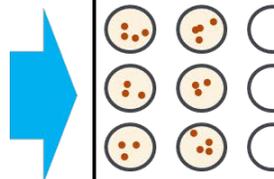
シロイヌナズナの根の蛍光観察 (新規色素の応用事例1)



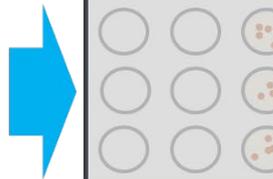
ムラシゲストック培地用混合塩類/
スクロース/ビタミンストック液混合
培地をオートクレーブで滅菌後、種
をまく



遮光して4°C2日間静置



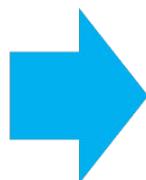
蛍光灯照射して室温で
4~6日間成長



色素ストック溶液に成
長したシロイヌナズナを
浸漬し遮光して1時間
程度染色



蛍光染色した根をプレパラートに
載せ、共焦点レーザー顕微鏡で
観察



励起波長を405nmに固定し、

410~445nmの青チャンネル、
445~481nmのターコイズチャンネル、
480~551nmの青緑チャンネル、
516~552nmの緑チャンネル、
552~588nmの黄色チャンネル、
588~605nmのオレンジチャンネル、
605~588nmの赤チャンネル、

の7つのバンドパスフィルターを観測フィルターに
して別々に取得し、画像解析ソフトでコントラスト
をつけてマージした。



最終的に得られた蛍光顕微鏡像

シロイヌナズナの根の蛍光観察 (新規色素の応用事例1)

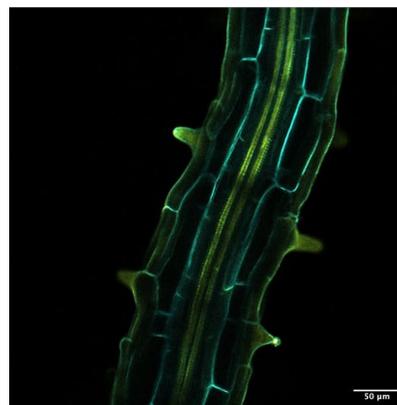


伸長領域

- ・道管らしき部分に長波長の周期的な構造が観測された
(金属イオンの影響?)
- ・根毛の蛍光色のコントラストが移行領域に比べはっきりしてきた

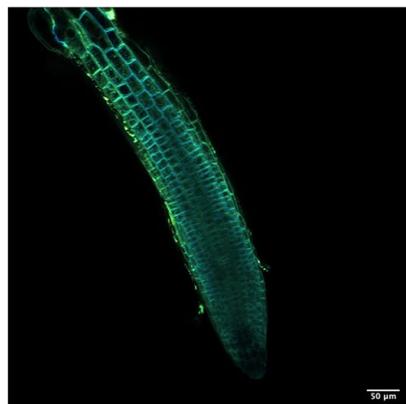
移行領域 (オレンジ・赤フィルター無し)

- ・道管らしき部分に長波長の周期的な構造が観測された
(金属イオンの影響?)
- ・根毛の部分に色素が集積し、長波長蛍光の領域も見られた



分裂領域・根冠 (オレンジ・赤フィルター無し)

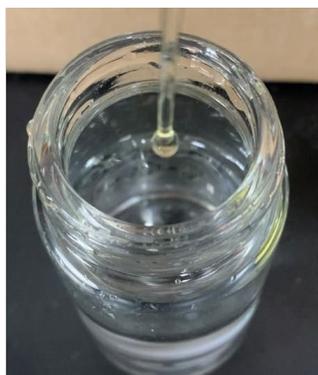
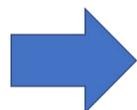
- ・根冠はほとんど蛍光染色されない
- ・分裂領域では内部の細胞の境界が選択的に染色され、
短波長の蛍光を示した
- ・一方、外周の細胞では部分的に長波長の蛍光を示している



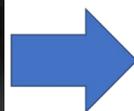
酸成長説(植物ホルモンであるオーキシンが細胞壁を酸性化し、細胞壁が緩むことで細胞が伸びる挙動が追跡できそうである。

将来的には農業製品の増産につながれば。

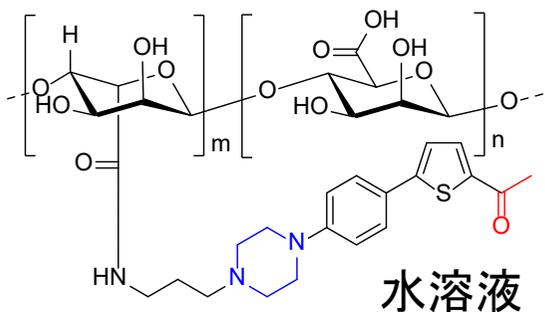
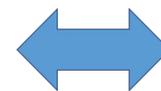
蛍光アルギン酸ゲルのセンサー応用 (新規色素の応用事例2)



ゲル化



繰り返し
応答



CaCl₂水溶液に添加

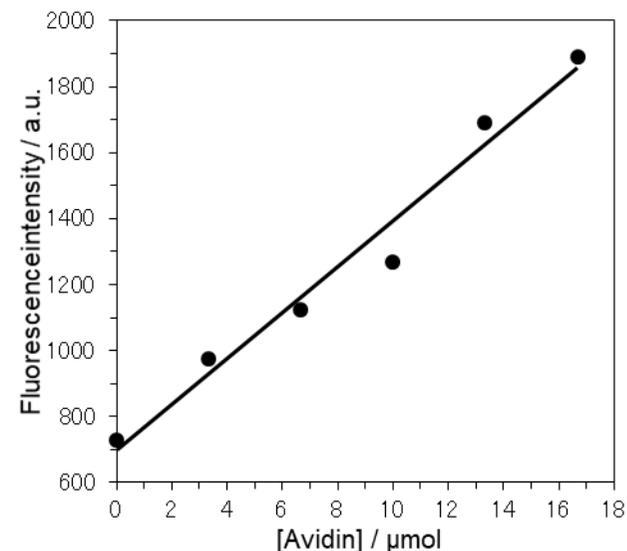
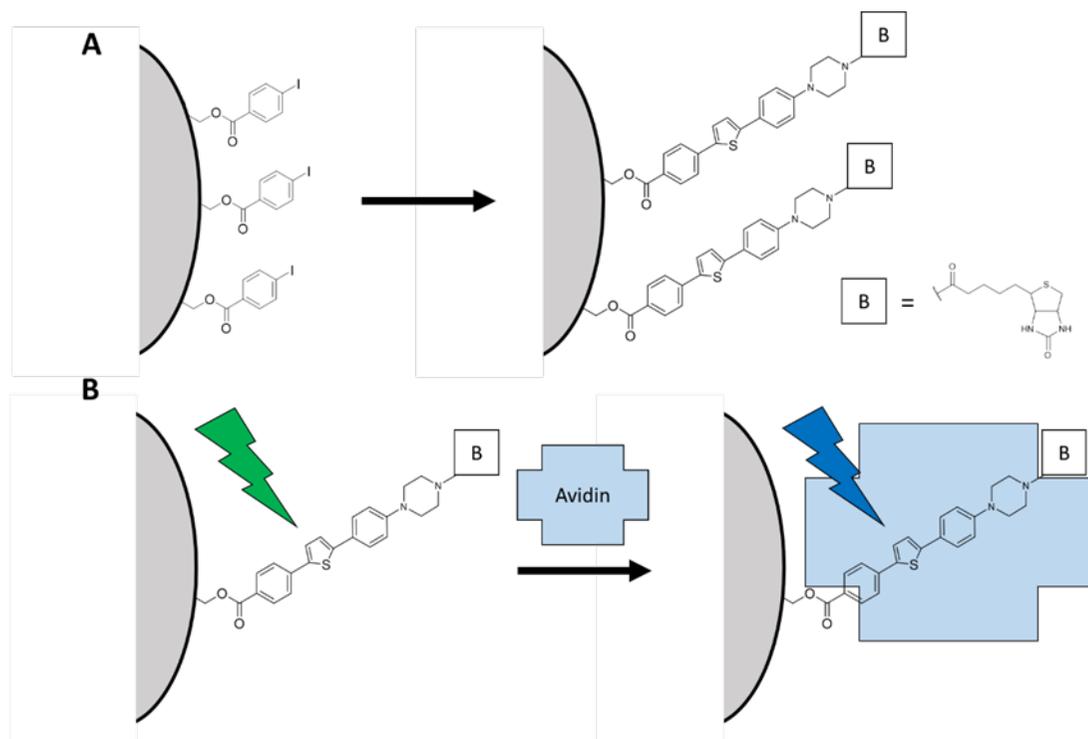
水に浸漬

メタノールに浸漬

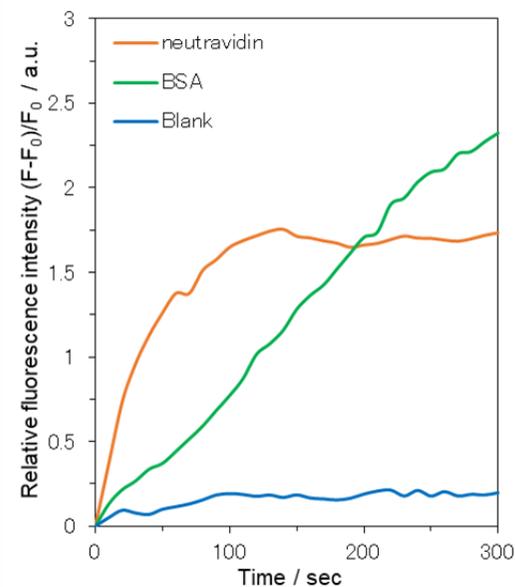
- ・水溶性が高いポリマー素材にラベル化することで水中でも蛍光波長応答するセンサー素材ができる。
- ・アルギン酸ゲルはカチオン性界面活性剤を吸着するので波長応答から臨界ミセル濃度以下の定量もできる。

アルギン酸のカルボキシ末端に
アミノ基を末端に持つ色素をラベル化

固相合成ポリマーを用いたセンサー応用 (新規色素の応用事例3)



- ・固相合成用ポリマーに新規色素とビオチンを順次鈴木—宮浦クロスカップリングなどで連結して、光導波路分光装置でアビジンの検出を試みた。
- ・アビジンの定量や吸着の経時変化の追跡ができることが分かった。



新技術の特徴・従来技術との比較

- 少なくとも3種類の分子間相互作用（ソルバトクロミズム・水素結合・配位結合）で発光色の変わる機能性蛍光色素ができた。
- 従来型色素より水溶性が高いため、水溶液中や植物細胞中でも蛍光色変化が観測できた。
- ピペラジン環を介して光物性を変えることなく、タンパク質・糖・合成ポリマー・ゲル・ガラス・金属などを蛍光標識できる。
- 従来型色素より安価に大量合成・生成できるので生体用蛍光プローブ以外にも応用しやすい。

想定される用途

- 生理活性物質などを導入して、酵素反応などの反応追跡。
- タンパク質などにラベル化して、変性などの構造変化追跡。
- ゲルやポリマーなどにラベル化して、保水性や成形性などの評価。
- ガラスや金属基板にラベル化して、センサー応用。

実用化に向けた課題

- 波長応答機構についてより詳細な解析を行っているところである。
- 色素誘導体を合成・評価し、吸収波長・蛍光波長・波長応答性などの知見を集める。
- 測定装置が最適化されていないので、高感度化に向けた調整を行う。

企業への期待

- 測定装置との最適化でより高感度の測定が期待できる。適した装置の共同開発。
- 比較的安価に提供できる可能性を生かして、生体用蛍光プローブは勿論、その他の用途の共同開発。例えばヘアケア、スキンケア、オーラルケア、食品分析、環境分析等。
- 測定目的に適した色素の共同開発、具体的にはソルバトクロミズム（親水/疎水性）・水素結合(pH)・配位結合性等による蛍光特性の制御等。

企業への貢献、PRポイント

- 用途に適合するか実現可能性のアドバイス。
- 用途に合わせて最適な電子求引性部位やラベル化部位などを持った色素誘導体を設計・合成の提案。
- 用法のプロトコル化に向けた提案。
- 工業的製法開発に関する提案。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称：蛍光化合物、蛍光イメージング用細胞染色剤、及び、細胞を染色する方法
- 出願番号：特願2024-143336
- 出願人：国立大学法人北海道大学
- 発明者：山田 幸司、上江洲 杏佳、
榎本 悟史、諸角 達也

産学連携の経歴

- 2005年- 化学発光色素などの特許出願に従事
- 2007年-2013年 文部科学省知的クラスター創成事業
Bio-Sに採択
- 2011年 大学発ベンチャー
ポラリス・テクノロジー社設立
- 2015年 監修を行った「鈴木ー宮浦クロス
カップリング体験キット2」が
和光純薬工業株式会社より発売

化学発光色素や近赤外蛍光色素などのお問い合わせもどうぞ

お問い合わせ先

北海道大学 産学・地域協働推進機構
産学協働マネージャー 栗橋 透

産学・地域協働推進機構 ワンストップ窓口
<https://www.mcip.hokudai.ac.jp/about/onestop.html>