

Title	生細胞でのリソソーム内pHの定量を可能とする蛍光プローブの開発
Sub Title	Development of a ratiometric fluorescent probe for quantifying the lysosomal pH in living cells
Author	花岡, 健二郎(Hanaoka, Kenjiro)
Publisher	福澤基金運営委員会
Publication year	2023
Jtitle	福澤諭吉記念慶應義塾学事振興基金事業報告集 (2022.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>リソソーム内のpHは弱酸性であり、酸性で活性化する様々な加水分解酵素によって生体成分を分解する。また、リソソーム病においては、リソソーム内pHの異常が疾病に繋がっているとの報告もある (JBC, 284, 7681-7686 (2009)など)。そのため、リソソーム内のpHを測定することは、疾病メカニズムの解明に繋がると期待される。本研究では、生きた細胞内で、リアルタイムにリソソーム内pHを定量可能な新たな蛍光プローブの開発を目的とした。</p> <p>申請者らによってこれまでに開発されているレシオ型pH蛍光プローブ : SiRpH類 (J. Am. Chem. Soc., 140, 5925-5933 (2018)) の励起波長を、蛍光顕微鏡のレーザー波長に適合させるためには20-30 nmの短波長化が必要であった。そこで、蛍光団母核をC-rhodamine(CR)類に代えたCRpH2を分子設計・合成し、その光学特性を調べた。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波長の561 nmと633 nmに最適であった。また、蛍光色素母核を変えることで、蛍光量子収率も大きく上昇させることに成功した。異なる2波長で励起した際の蛍光強度のレシオ値変化の値は、$pK_a = 5.5$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を酸性オルガネラである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され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。その結果、マーカータンパク質とプローブの蛍光が高い重なりを示した蛍光画像が観察され、リソソーム内の平均pHは5.1となり、これまでの報告と矛盾のない値であった。このように、汎用性の高いリソソーム内pHの測定に適した蛍光プローブの開発に成功した。</p> <p>The pH in lysosomes is weakly acidic, and the lysosomes contain various hydrolases, which can be activated in acidic conditions and metabolize biomolecules. Further, it is reported that, in the lysosomal diseases, the lysosomal pH is unordinary and this may be deeply related to these diseases (JBC, 284, 7681-7686 (2009), etc.). Therefore, to measure the lysosomal pH is expected to lead to the elucidation of the mechanism of these diseases. In this study, we aimed to develop novel fluorescent probes for quantifying the lysosomal pH in living cells in real time.</p> <p>So far, the applicants have developed ratiometric fluorescent probes for pH: SiRpHs (J. Am. Chem. Soc., 140, 5925-5933 (2018)), and their excitation wavelengths need to be 20-30 nm shortened to be fit for the widely used laser wavelengths of the confocal fluorescence microscopy. So, we designed and synthesized CRpH2 by changing the dye scaffold of the pH probes to C-rhodamine (CR) and examined their photophysical properties. As a result, we succeeded in shortening the absorption wavelength of the pH probes, and their wavelength was suitable for the widely used lasers, i.e., 561 nm and 633 nm. Moreover, we also succeeded in a large increment of the fluorescence quantum yield of the pH probes by changing the dye scaffold of the pH probes. The fluorescence intensity ratio by using 2 different excitation wavelengths was calculated to show $pK_a = 5.5$, and this pK_a value was suitable for the measurement of the lysosomal pH. Then, to deliver the developed pH probe, CRpH2, to the acidic organelle lysosomes, we labelled CRpH2 to a macromolecule dextran (Dex), which is well-known to be delivered to lysosomes by endocytosis, and prepared CRpH2-Dex. Then, we applied CRpH2-Dex to EGFP-fused Tmem192 (lysosomal marker protein)-stably expressing MEF cells, and performed the live-cell fluorescence imaging. As a result, the well-merged fluorescence image between the marker proteins and the pH probes was observed, and the average lysosomal pH value was calculated to be 5.1, which is consistent to that of the previous reports. Thus, we successfully developed a widely useable pH fluorescent probe optimal for the measurement of the lysosomal pH.</p>
Notes	申請種類 : 福澤基金研究補助
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO12003001-20220003-0026

保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

研究代表者	所属	薬学部	職名	教授	補助額	1,500 千円
	氏名	花岡 健二郎	氏名 (英語)	Kenjiro Hanaoka		
研究課題 (日本語)						
生細胞でのリソソーム内 pH の定量を可能とする蛍光プローブの開発						
研究課題 (英訳)						
Development of a ratiometric fluorescent probe for quantifying the lysosomal pH in living cells						
研究組織						
氏 名 Name		所属・学科・職名 Affiliation, department, and position				
花岡 健二郎 (Kenjiro Hanaoka)		薬学部・薬科学科・教授				
1. 研究成果実績の概要						
<p>リソソーム内の pH は弱酸性であり、酸性で活性化する様々な加水分解酵素によって生体成分を分解する。また、リソソーム病においては、リソソーム内 pH の異常が疾病に繋がっているとの報告もある (JBC, 284, 7681-7686 (2009) など)。そのため、リソソーム内の pH を測定することは、疾病メカニズムの解明に繋がると期待される。本研究では、生きた細胞内で、リアルタイムにリソソーム内 pH を定量可能な新たな蛍光プローブの開発を目的とした。</p> <p>申請者らによってこれまでに開発されているレシオ型 pH 蛍光プローブ: SiRpH 類 (J. Am. Chem. Soc., 140, 5925-5933 (2018)) の励起波長を、蛍光顕微鏡のレーザー波長に適合させるためには 20-30 nm の短波長化が必要であった。そこで、蛍光団母核を C-rhodamine (CR) 類に代えた CRpH2 を分子設計・合成し、その光学特性を調べた。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波長の 561 nm と 633 nm に最適であった。また、蛍光色素母核を変えることで、蛍光量子収率も大きく上昇させることに成功した。異なる 2 波長で励起した際の蛍光強度のレシオ値変化の値は、$pK_a = 5.5$ 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 を酸性オルガネラである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され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。その結果、マーカータンパク質とプローブの蛍光が高い重なりを示した蛍光画像が観察され、リソソーム内の平均 pH は 5.1 となり、これまでの報告と矛盾のない値であった。このように、汎用性の高いリソソーム内 pH の測定に適した蛍光プローブの開発に成功した。</p>						
2. 研究成果実績の概要 (英訳)						
<p>The pH in lysosomes is weakly acidic, and the lysosomes contain various hydrolases, which can be activated in acidic conditions and metabolize biomolecules. Further, it is reported that, in the lysosomal diseases, the lysosomal pH is unordinary and this may be deeply related to these diseases (JBC, 284, 7681-7686 (2009), etc.). Therefore, to measure the lysosomal pH is expected to lead to the elucidation of the mechanism of these diseases. In this study, we aimed to develop novel fluorescent probes for quantifying the lysosomal pH in living cells in real time.</p> <p>So far, the applicants have developed ratiometric fluorescent probes for pH: SiRpHs (J. Am. Chem. Soc., 140, 5925-5933 (2018)), and their excitation wavelengths need to be 20-30 nm shortened to be fit for the widely used laser wavelengths of the confocal fluorescence microscopy. So, we designed and synthesized CRpH2 by changing the dye scaffold of the pH probes to C-rhodamine (CR) and examined their photophysical properties. As a result, we succeeded in shortening the absorption wavelength of the pH probes, and their wavelength was suitable for the widely used lasers, i.e., 561 nm and 633 nm. Moreover, we also succeeded in a large increment of the fluorescence quantum yield of the pH probes by changing the dye scaffold of the pH probes. The fluorescence intensity ratio by using 2 different excitation wavelengths was calculated to show $pK_a = 5.5$, and this pK_a value was suitable for the measurement of the lysosomal pH. Then, to deliver the developed pH probe, CRpH2, to the acidic organelle lysosomes, we labelled CRpH2 to a macromolecule dextran (Dex), which is well-known to be delivered to lysosomes by endocytosis, and prepared CRpH2-Dex. Then, we applied CRpH2-Dex to EGFP-fused Tmem192 (lysosomal marker protein)-stably expressing MEF cells, and performed the live-cell fluorescence imaging. As a result, the well-merged fluorescence image between the marker proteins and the pH probes was observed, and the average lysosomal pH value was calculated to be 5.1, which is consistent to that of the previous reports. Thus, we successfully developed a widely useable pH fluorescent probe optimal for the measurement of the lysosomal pH.</p>						
3. 本研究課題に関する発表						
発表者氏名 (著者・講演者)	発表課題名 (著書名・演題)	発表学術誌名 (著書発行所・講演学会)	学術誌発行年月 (著書発行年月・講演年月)			
野本 歩夢、花岡 健二郎、浦野 泰照	細胞内オルガネラ pH を定量可能なレシオ型 pH 蛍光プローブの開発	日本薬学会 第 143 年会	2023 年 3 月 26 日			
花岡 健二郎 (招待講演)	ケイ素置換キサンテン系蛍光色素の創製と蛍光プローブの開発	第 26 回 ケイ素化学協会シンポジウム	2022 年 11 月 11 日			
花岡 健二郎 (招待講演)	新規蛍光団の創製を基盤とした蛍光プローブの開発	第 9 回 バイオ関連化学シンポジウム 若手フォーラム	2022 年 9 月 9 日			
花岡 健二郎 (招待講演)	新規蛍光団の創製を基盤とした蛍光プローブの開発	埼玉大学先端産業国際ラボラトリー・メディカルイノベーション研究ユニット 第 22 回 ワークショップ: バイオイメージングの最前線 一生体分子の可視化	2022 年 12 月 14 日			

花岡 健二郎(招待講演)	医療・創薬への応用を目指した蛍 光プローブの創製	未来医学研究会 マンスリーセミナー VOL.25	2022 年 9 月 15 日
--------------	-----------------------------	--------------------------	-----------------